

УНИВЕРЗИТЕТ "СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ" - СКОПЈЕ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОГИЈА

ЕМИЛИЈА НАКОВА

ФИТОПЛАЗМИТЕ КАКО ПРИЧИНИТЕЛИ НА ЖОЛТИЛО
КАЈ ВИНОВАТА ЛОЗА (*VITIS VINIFERA* L.)
ВО РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА

Магистерски труд

Скопје, 2008 год.

Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ - Скопје
Природно-математички факултет
Институт за биологија

Дипл. проф. биол. Емилија Накова

**ФИТОПЛАЗМИТЕ КАКО ПРИЧИНИТЕЛИ НА ЖОЛТИЛО
КАЈ ВИНОВАТА ЛОЗА (*VITIS VINIFERA* L.) ВО РЕПУБЛИКА
МАКЕДОНИЈА**

Магистерски труд



Скопје, 2008 год.

Ментор:

проф. д-р Саша Митрев

редовен професор
Земјоделски факултет
Универзитет „Гоце Делчев“, Штип

Членови на комисијата:

проф. д-р Саша Митрев

редовен професор
Земјоделски факултет
Универзитет „Гоце Делчев“, Штип

проф. д-р Мирко Спасеноски

редовен професор
Природно-математички факултет,
Институт за биологија, Скопје

проф. д-р Филип Пејчиновски

редовен професор во пензија
Факултет за земјоделски науки и
храна, Скопје

Научна област:

растителна биотехнологија

Датум на одбрана:

Датум на промоција:

Овој магистерски труд е изработен во Лабораторијата за заштита на растенијата при Земјоделскиот факултет, Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип, под водство на проф. д-р Саша Митрев. Дел од лабораториските испитувања се направени во лабораторијата на д-р Elisa Angelini од Istituto Sperimentale per la viticoltura, Конелијано (Тревизо), Италија

БЛАГОДАРНОСТ

Со големо задоволство му изразувам неизмерна благодарност на мојот професор и ментор **проф. д-р Саша Митрев**, со кого имав чест да работам во изминатите четири години. Голем научник кој несебично ми го пренесуваше своето знаење, искуство, ентузијазам и љубов кон науката. Ме насочи кон проблематиката со фитоплазмите во нашата земја и ми ги овозможи сите неопходни услови за истражување.

Со голема почит му изразувам огромна благодарност на **проф. д-р Мирко Спасеноски** од Природно-математичкиот факултет, Институт за биологија, кој со својата професионалност и со своите конкретни и конструктивни забелешки, значително придонесе за обликување на овој магистерски труд.

Искрена благодарност му должам на **проф. д-р Филип Пејчиновски** од Факултетот за земјоделски науки и храна во Скопје, за драгоцените совети и искуства кои придонесоа за успешна изработка на оваа магистерска теза.

Голема благодарност изразувам до **проф. д-р Илија Каров** за моралната и финансиската поддршка, како и до целиот тим при Земјоделскиот факултет, Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип, кои директно или индиректно ми помогнаа во текот на истражувањето.

Посебна благодарност должам на **д-р Elisa Angelini** од Istituto Sperimentale per la viticoltura, Конелијано (Тревизо), Италија, која несебично ми ги отвори вратите на својата лабораторија, ми ја стави на располагање целата своја опрема и ме внесе во светот на молекуларните испитувања и дијагностицирања. Благодарност и до **Luisa Filippin** од истиот Институт, која неизмерно се трудеше во објаснувањето на клучните моменти во детерминацијата на фитоплазмите.

Огромна благодарност изразувам и до колегата **Васко Златковски** од Агенцијата за развој на земјоделството во Штип, кои ми помогна во организацискиот теренски дел и воспоставување на контакти со агрономите на лозовите насади во Македонија.

Благодарност до колегата **Дејан Миланов**, за помошта во двегодишната теренска работа при колекционирањето на материјалот за анализа.

Неизмерна благодарност му изразувам на **моето семејство и мојот најсакан брат**, за нивната безрезервна поддршка, поттик и совети кои ми даваа сила за работа и успех во животот.

Најискрена благодарност на мојот сопруг **Димитар Костадиновски**, за разбирањето и безрезервната поддршка што ја имав во секој момент.

Огромна благодарност до сите кои на било кој начин ми помогнаа во изработката на мојот магистерски труд.

Со најискрена почит,

Емилија Накова,

Штип, 2008 г.

СОДРЖИНА

СОДРЖИНА	iv
АПСТРАКТ	vi
ABSTRAKT	vii
ЛИСТА НА КРАТЕНКИ	viii
ЛИСТА НА ТАБЕЛИ	ix
ЛИСТА НА СЛИКИ	x
1. ВОВЕД	
1.1. Патогени промени кај виновата лоза	6
1.2. Начин на пренесување на фитоплазмите	9
2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРА	
2.1. Општи податоци за фитоплазмите	10
2.2. Градба на геномот на фитоплазмите	11
2.3. Класификација на фитоплазмите	13
2.4. Проучување на фитоплазматските болести кај виновата лоза во светот	17
2.5. <i>Flavescence doreé</i> (златно жолтило)	18
2.6. <i>Bois noir</i> (црно дрво)	19
2.7. Други групи на жолтила кај виновата лоза	20
2.8. Проучување и познавање на жолтилото кај виновата лоза во Република Македонија	21
2.9. Економско значење на фитоплазмите кај виновата лоза	22
3. ЦЕЛ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО	
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД НА РАБОТА	
4.1. Досегашни користени методи за идентификација на фитоплазмите	25
4.1.1. Молекуларни методи на детекција на фитоплазмите	27
4.1.2. Метода на полимеразна верижна реакција (Polymerase Chain Reaction, PCR)	27
4.1.3. Вгнезден PCR (<i>Nested PCR</i>)	31
4.1.4. PCR метода во детекција на фитоплазмите	31
4.1.5. RFLP анализа на PCR добиените фрагменти од DNA	33
4.1.6. Проблеми во детекцијата на фитоплазмите	35
4.2. Материјал за работа	36
4.2.1. Собирање на примероци од растенија со симптоми на жолтило во лозовите насади во Република Македонија	37

4.2.2. Пуфери и раствори кои беа користени при лабораториските анализи	39
4.2.2.1. Пуфери и раствори за изолација и чување на ДНК од растителниот материјал	39
4.2.2.2. Пуфери и раствори за електрофореза во агарозен гел	40
4.2.2.3. Пуфери и раствори за електрофореза во полиакриламиден гел	40
4.2.2.4. Ензими, стандарди за одредување на молекулската маса и хемикалии	41
5.1.2.4.1. Ензими	41
4.2.2.5. Стандарди за одредување на молекулската маса	41
4.2.2.6. Хемикалии	42
4.3. Методи на работа	43
4.3.1. Изолација на дезоксирибонуклеинските киселини (ДНК) од растителното ткиво	43
4.3.2. Умножување на фитоплазматскиот 16S rDNA ген со полимеразно верижна реакција	44
4.3.3. Анализа на умножените фрагменти со електрофореза во 1% агарозен гел	49
4.3.4. Анализа на полиморфизмот на должина на рестрикциските фрагменти (RFLP) на фитоплазматскиот 16S rDNA ген	49
5. РЕЗУЛТАТИ	
5.1. Симптоми од фитоплазматско жолтило кај виновата лоза	51
5.2. Умножување на фитоплазматскиот 16S rDNA ген со полимеразно верижна реакција	62
5.3. Полиморфизам по должина на рестрикциските фрагменти (RFLP), на фитоплазматскиот 16S rDNA ген	68
6. ДИСКУСИЈА	
6.1. Симптоматологија	75
6.2. Методолошки пристап за детекција и идентификација на фитоплазмите кај различни сорти на винова лоза	77
6.3. Појава и застапеност на фитоплазмите кај виновата лоза на територијата на Република Македонија	79
7. ЗАКЛУЧОК	81
8. ЛИТЕРАТУРА	85
9. ПРИЛОГ	94

ФИТОПЛАЗМИТЕ КАКО ПРИЧИНИТЕЛИ НА ЖОЛТИЛО КАЈ ВИНОВАТА ЛОЗА (*VITIS VINIFERA* L.) ВО РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА

Магистерски труд

Дипл. проф. по биол. Емилија Накова

АПСТРАКТ

Испитувањата на болестите кај виновата лоза (*Vitis vinifera* L.), спроведени во периодот на 2006 и 2007 година, претставуваат првите подетални испитувања на поголемите лозови површини за присуството/отсуството на фитоплазмите, причинители на жолтило кај различни сорти на винова лоза. Во ова истражување беа опфатени 7 локалитети со 13 виногорја.

Фитоплазмите се растителни прокариоти, кои не поседуваат клеточен сид, а до денес се забележани како предизвикувачи на повеќе од седумстотини болести кај различни растителни видови.

Кај фитоплазматски заболениите чокоти, како најзначајни се регистрирани следниве промени: жолтило/црвенило на листовите, завиткување на листовите навнатре и триаголен изглед, овенување и сушење на цветовите и гроздовите, овенување и горчлив вкус на зрната, незадрвенување и еластичност на ластарите и нивно изумирање во зима, како и сушење и предвремено изумирање на лозите. Овие промени, посебно оние кои се манифестираат на цветовите и гроздовите, доведуваат до намалување на приносот на грозје и влошување на квалитетот на виното. Чокотите кај виновата лоза заболени од фитоплазми остануваат трајно заразени.

Масовно пропаѓање на заболениите лозови насади, односно заболениите чокоти од фитоплазмите, е регистрирано кај сортите *шардоне* и *вранец*. Овие сорти се покажале како премногу осетливи кон патогените од групата фитоплазмози кои ја заразуваат виновата лоза. Значително помала осетливост спрема фитоплазмите, наспроти сортите *шардоне* и *вранец*, покажале сортите *италијански ризлинг* и *рајнски ризлинг*.

Молекуларната детекција и идентификација на фитоплазмите е направена со примена на полимеразно верижна реакција (Polymerase Chain Reaction, PCR), вгнезден PCR (Nested PCR), проследени со техника на полиморфизам на должината на рестрикциските фрагменти (анг. Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP).

Резултатите кои се добиени од овие испитувања на фитоплазмите кај виновата лоза за прв пат ја потврдија фитоплазмата *Bois noir* (столбур), во сите испитувани локалитети во Македонија.

Направена е типизација и е потврдено присуството на *Bois noir* (stolbur), тип VKII.

Клучни зборови: *Bois noir*, столбур, полимеразна верижна реакција, вгнезден PCR, полиморфизам на должината на рестрикциските фрагменти

University „Ss. Cyril and Methodius“ - Skopje
Faculty of Natural Science and Mathematics
Institute of biology

PHYTOPLASMAS, CAUSAL AGENT OF GRAPEVINE YELLOWS DISEASES IN THE REPUBLIC OF MACEDONIA

Master Thesis

Emilija Nakova, B.Sc.

ABSTRACT

Surveys and investigations of grapevine diseases, checking the presence/absence of phytoplasmas - causal agent of grapevine yellows in different variety of grapevine, were made for the first time during the period of 2006 and 2007, in the bigger vineyards in Macedonia. 7 localities and 13 regions under grapevine were analysed in this study.

Phytoplasmas are cell wall-less plant pathogenic prokaryotes, causing more than 700 diseases in different plant species.

The following pathological changes have been recorded on diseased vines: yellowing-or-reddening of leaves, wilting and triangle-shaped leaves rolling, drying of flowers and clusters, withering and bitter taste of berries, un lignified and rubbery canes and their freezing during winter, as well as decline and death of vines in case of very sensitive variety. The consequences of the mentioned symptoms are yield loss and not proper quality of wine.

The vines infected by phytoplasmas remain permanently diseased.

Mass and severe decline of vines infected by phytoplasmas was recorded in vineyards with *chardonnay* cv. and *vranec*, which showed to be very sensitive to the studied pathogens. Somewhat, less susceptibility to GY have shown by *riesling italian* and *rhein riesling*.

Molecular detection and identification of phytoplasmas were done using polymerase chain reaction (PCR), nested PCR following by restriction fragment length polymorphism (RFLP). The results have shown the presence of Bois noir phytoplasma in all investigated region in Macedonia.

We made tipisation and confirm the presence of *Bois noir* (stolbur), type VKII.

Key word: *Bois noir*, stolbur, polymerase chain reaction, nested PCR, restriction fragment length polymorphism

ЛИСТА НА КРАТЕНКИ И

КОНВЕНЦИОНАЛНИ ТЕРМИНИ

ДНК	дезоксирибонуклеинска киселина
PCR	полимеразна верижна реакција
RFLP	полиморфизам на должина на рестрикциските фрагменти
dNTP	деоксинуклеозид трифосфат
dATP	деоксиаденозин трифосфат
dGTP	деоксигуанозин трифосфат
dCTP	деоксцитидин трифосфат
dTTP	деоксиатимидин трифосфат
СТАВ	цетил триметил амониум бромид
EDTA	етилендиамино тетраоцетна киселина
TBE	Tris-borat-EDTA пуфер
TE	Tris-EDTA пуфер
TEMED	N,N,N',N'-тетраметилетилендиамин
APS	амониум персулфат
BN	<i>Bois noir</i>
FD	<i>Flavescencae dorée</i>

ЛИСТА НА ТАБЕЛИ

Табела 1. Прајмери за PCR амплификација на 16S rDNA генот на фитоплазмите (Jones, 2002)	32
Табела 2. Специфични прајмери за амплификација на FD9 ДНК фрагментот од групата Elm yellows фитоплазми (жолтило на брестот) (Angelini et al., 2001)	32
Табела 3. Шифрарник користен во базата на податоци за виновата лоза	38
Табела 4. Локалитети од кои беше колекциониран материјалот за анализа и симптоми од теренските прегледи	52
Табела 5. Резултати добиени со користење на различни групи на прајмери за докажување на присуството на фитоплазмите во текот на испитуваната сезона 2006	63
Табела 6. Резултати добиени со користење на различни групи на прајмери за докажување на присуството на фитоплазмите во текот на испитуваната сезона 2007	64
Табела 7. Резултати за раширеноста на фитоплазмата <i>Bois noir</i> по локалитети и сорти добиени со анализа на примероците од винова лоза во сезоната 2006/07	73

ЛИСТА НА СЛИКИ

Слика 1. Површина под лозови насади на територијата на Република Македонија за 2007 година (карта извадена од Државен завод за статистика, 2007)	4
Слика 2. Електронска микроскопија на различни модификации на флоемските садови, полиморфизам и различни димензии на фитоплазмите (слика превземена од Bertaccini A., 2007)	11
Слика 3. Филогенетска припадност на фитоплазмите во зависност од застапеноста на паровите на бази (слика превземена од http://www.mbio.ncsu.edu/MB451/lecture/firmicutes/lecture.html)	12
Слика 4. Поделба во внатрешноста на класата <i>Mollicutes</i> (слика превземена од http://papilio.ab.a.u-tokyo.ac.jp/planpath/phyto-genome/index.html)	15
Слика 5. Приказ на PCR реакцијата	30
Слика 6. Карактеризација на фитоплазмите со RFLP метода	34
Слика 7. Локација на прајмерите за 16SrDNA регионот кои беа користени при идентификација на фитоплазмите кај виновата лоза * директен PCR * вгнезден(nested) PCR	45
Слика 8. Локација на прајмерите за <i>tuf</i> генот кои беа користени при идентификација на фитоплазмиата <i>Bois noir</i> кај виновата лоза * директен PCR * вгнезден(nested) PCR	46
Слика 9. Симптоми на фитоплазматско жолтење кај сортата <i>белан</i> од лозовиот регион Хамзали во Струмица	55
Слика 10. Симптоми на фитоплазматско жолтење кај сортата <i>шардоне</i> од лозовиот регион Сопот во Велес	56
Слика 11. Симптоми кај сортата <i>шардоне</i> од лозовиот регион Ило Виларов, Неготино – доцен стадиум на болеста	56
Слика 12. Симптоми на фитоплазматско „поцрвенување“ кај сортата <i>бургундец црн</i> (материјал колекциониран од лозовиот регион Три чешми, Штип)	57
Слика 13. Некротирање на заболените листови - сорта <i>бургундец црн</i> (материјал колекциониран од лозовиот регион Три чешми, Штип)	57
Слика 14. Недоволно задрвенување кај сортата <i>вранец</i>	57
Слика 15. Заболени ластари кај сортата <i>шардоне</i>	57

Слика 16. Смижување на зрната и сушење на гроздинките кај сортата <i>шардоне</i> (материјал колекциониран од лозовиот регион Сопот во Велес и Три Чешми, Штип)	58
Слика 17. Целосно исушување на заболената лозанка (<i>бургундец црн</i>) (материјал колекциониран од лозовиот регион Сопот во Велес и Три Чешми, Штип)	58
Слика 18. Интензивно црвенило на целата лозанка кај сортата <i>вранец</i> (материјал колекциониран од лозовиот регион Хамзали, Струмица)	59
Слика 19. Почетен стадиум на развој на болеста – зафатени само мал број на листови (типична системична промена на бојата)	59
Слика 20. Симптоми на жолтило кај сортата <i>смедеревка</i> , предизвикани од повреда - при агротехнички мерки од човекот	60
Слика 21. Типични симптоми карактеристични за фитоплазмозите, предизвикани од инсект а) повреда од инсект во вид на прстен (мазен светлокафеав прстен) б) постара повреда од инсект во вид на прстен (распукната и задебелена)	61
Слика 22. Резултат од електрофорезата во 1% агарозен гел на PCR амплифицираните продукти на фитоплазматскиот ген кај примероци од винова лоза, колекционирани во сезоната 2006. За умножување беше користен прајмерскиот пар R16 P1P7 - M1B6	65
Слика 23. Резултат од електрофорезата во 1% агарозен гел на PCR амплифицираните продукти на фитоплазматскиот <i>tuf</i> ген кај примероци од винова лоза колекционирани во сезоната 2006. За умножување беше користен прајмерскиот пар FTufAY-RTufAY	66
Слика 24. Резултат од електрофорезата во 1% агарозен гел на PCR амплифицираните продукти на фитоплазматскиот ген кај примероци од винова лоза колекционирани во сезоната 2007. За умножување беше користен прајмерскиот пар P1P7 - M1B6	67
Слика 25. Рестрикциски профили на специфичните <i>tuf</i> ампликони, добиени со помош на <i>HpaII</i> рестрикцискиот ензим, визуелизирани во 13% полиакриламиден гел	69
Слика 26. Рестрикциски профили (на ампликоните добиени со nested PCR-от, со прајмерскиот пар M1B6), добиени со помош на <i>TaqI</i> рестрикцискиот ензим, визуелизирани во 13% полиакриламиден гел	70

Слика 27. Рестрикциски профили на специфичните *tuf* ампликони, добиени со помош на *TaqI* и *HpaII* рестрикцискиот ензим, визуелизирани во 13% агарозен гел

71

Слика 28. Рестрикциски профили (на ампликоните добиени со nested PCR-от, со прајмерскиот пар IF1R1), добиени со помош на *Tru 9I* рестрикцискиот ензим, визуелизирани во 13% агарозен гел

72

1. ВОВЕД

Виновата лоза (*Vitis vinifera* L.) е една од најраспространетите земјоделски култури во светот, која зафаќа површина од околу 10 милиони хектари. Лозарството не е само важна економска гранка, туку има и долгогодишна традиција за одгледување во нашиот регион.

Историјата на лозарството и правењето на вино започнува од пред 4000 години, со првите големи цивилизации. Асирците во Мала Азија, неколку милениуми пред Христос, први ја култивирале виновата лоза. Во Библијата на многу места се споменати лозата и виното и според Стариот Завет, по потопот, Ное засадил лоза на врвот на планината Арарат.

Египетската цивилизација ја одгледувала виновата лоза во старата Империја, околу 3.000 години пр.н.е., за што сведочат хиероглифите на кои е прикажано како на сонцето се сушат гроздови. Подоцна, во новата империја, 1.500 години пр.н.е., лозови насади имало скоро по целата должина на делтата на реката Нил. Славејќи го богот Озирис, неговата смрт и воскресувањето, Египќаните всушност го славеле крајот на вегетацијата на виновата лоза во зима и нејзиниот почеток во пролет.

На исток од Медитеранот, Хебрејците ја култивирале виновата лоза, го славеле гроздоберот со фестивали, а собраното грозје го ферментирале во големи глинени садови. Хебрејците, традицијата на одгледувањето на виновата лоза им ја пренеле на Фениќаните, а тие, пак, на други антички народи. Фениќаните како добри морепловци и трговци ја рашириле виновата лоза низ целиот Медитеран, од Мала Азија па сè до Шпанија. Марсеј во Франција и Емпорион во Шпанија стануваат најголеми центри на експанзија за виновата лоза и виното во овие земји. Според античката митологија, виното е пијалак на боговите.

По пропаѓањето на империјата на античка Македонија и државите настанати од неа, Римската Империја ја презема најголема улога во ширењето на виновата лоза во цела Европа. Империјата била толку поврзана со лозарството и винарството, така што секаде каде што имало нејзина експанзија имало и експанзија на виновата лоза. За Римјаните, виното било извор на среќа и богатство, а Бакхус бил бог на виното кој го славеле.

Со појавата на христијанството, продолжува и понатаму традицијата на одгледување на виновата лоза. Но со паѓањето на Римската Империја и со доаѓањето на

варварските народи од север, лозарството било уништено и производството на вино речиси исчезнало, но благодарение на Црквата и верувањето дека виното ја претставува крвта на Исус Христос, виновата лоза сепак продолжила да опстојува.

Во Македонија виновата лоза почнала да се одгледува под доминацијата на средоземноморските цивилизации, а големо влијание имала и Римската Империја. Во Византискиот период (до VII век) и во времето на големите миграции на Балканот, традицијата за одгледувањето на виновата лоза и натаму продолжила.

Античките Македонци биле едни од најголемите обожаватели на виното. Тие го третирале виното како еден од најважните сегменти во својот живот, а во својот религиозен корпус имале и бог на виното. Тоа е познатиот бог Дионис. Тој бил создаден во имагинацијата на македонското племе Бриги, кои имале значителна улога во етногенезата на античките народи. Значењето на виното за античките Македонци било пренесувано од сите антички историчари, кои пишувале за подвизите на Александар Македонски и ја споменувале приврзаноста кон македонското вино, што во тоа време ја негувале славните македонски владетели и нивните поданици. Од историјата е познато дека Александар Македонски по секоја добиена битка ги честел своите војници со добро црвено вино.

За време на Турската Империја (од XIV до XX век), лозарството и винарството во Македонија доживеале стагнација и промена на сортиментот. Во ова време под влијание на исламската религија најмногу се одгледувани трпезни сорти. Сепак, винските сорти се среќавале и одгледувале покрај манастирите, каде се правело вино со кое христијанската вера ги крштевала, венчала и погребувала луѓето, па така лозата и виното одиграле голема улога во сочувувањето на христијанските обичаи и вера.

Во почетокот на XX век, во Македонија виновата лоза е застапена со површина од околу 30.000 ha, кои до 1914 година биле речиси целосно уништени од филоксерата, штетен инсект кој го напаѓа коренот на питомата лоза. Потоа, следувало обновување на лозарството и тренд на пораст на површините под винова лоза, при што максимумот бил достигнат во 1981 година, кога се регистрирани 38.759 ha.

Успешноста на лозарството и винарството, пред сè, е условена од постоењето на поволни агроеколошки услови, а тие во Република Македонија се токму такви и овозможуваат непречено и квалитетно одгледување на голем број на сорти, како трпезни така и вински.

Лозата е симбол на растение кое живее долго (дури цел век), па поради тоа, некогаш, а и денес, луѓето често пати знаат да го употребат терминот "од која лоза сте?" кое има значење "од која фамилија сте?".

Република Македонија е сончева и планинска земја во срцето на Балканот, со векови позната како производител на најдобрите вина во регионот.

Климатскиот тип на Република Македонија се формира под влијание на медитеранска, континентална и локална планинска клима. Континенталната клима своето влијание го манифестира по течението на реката Вардар, сè до Демир Капија и реката Струмица, односно Струмичко Поле. Влијанието на изменетата медитеранска клима се чувствува по должината на реката Вардар, на север до Скопје. Високите планински масиви на запад претставуваат природна пречка, која го оневозможува влијанието на топлите струи од Јадранското море и покрај неговата непосредна близина. Континенталната клима е карактеристична за западна и источна Македонија, додека изменетата Медитеранска клима започнува да влијае од крајниот југ – Ѓевгелија и Струмица, па сè до централниот дел – Велес, со што ѝ опфаќа површините на Повардарскиот реон.

Како резултат на влијанието на овие климатски услови, лозарството во Македонија е поделено на три лозарски реони, и тоа:

I реон – Повардарски / Централен вардарски реон, кој зафаќа најголем дел од површините, повеќе од 80% каде се наоѓа и најголемото производство;

II реон – Пчинско–осоговски реон / Источен лозарски реон, со околу 11%;

III реон – Пелагониско-полошки реон / Западен лозарски реон, кој зафаќа околу 9%.

Секој реон понатаму е поделен на шеснаесет виногорја.

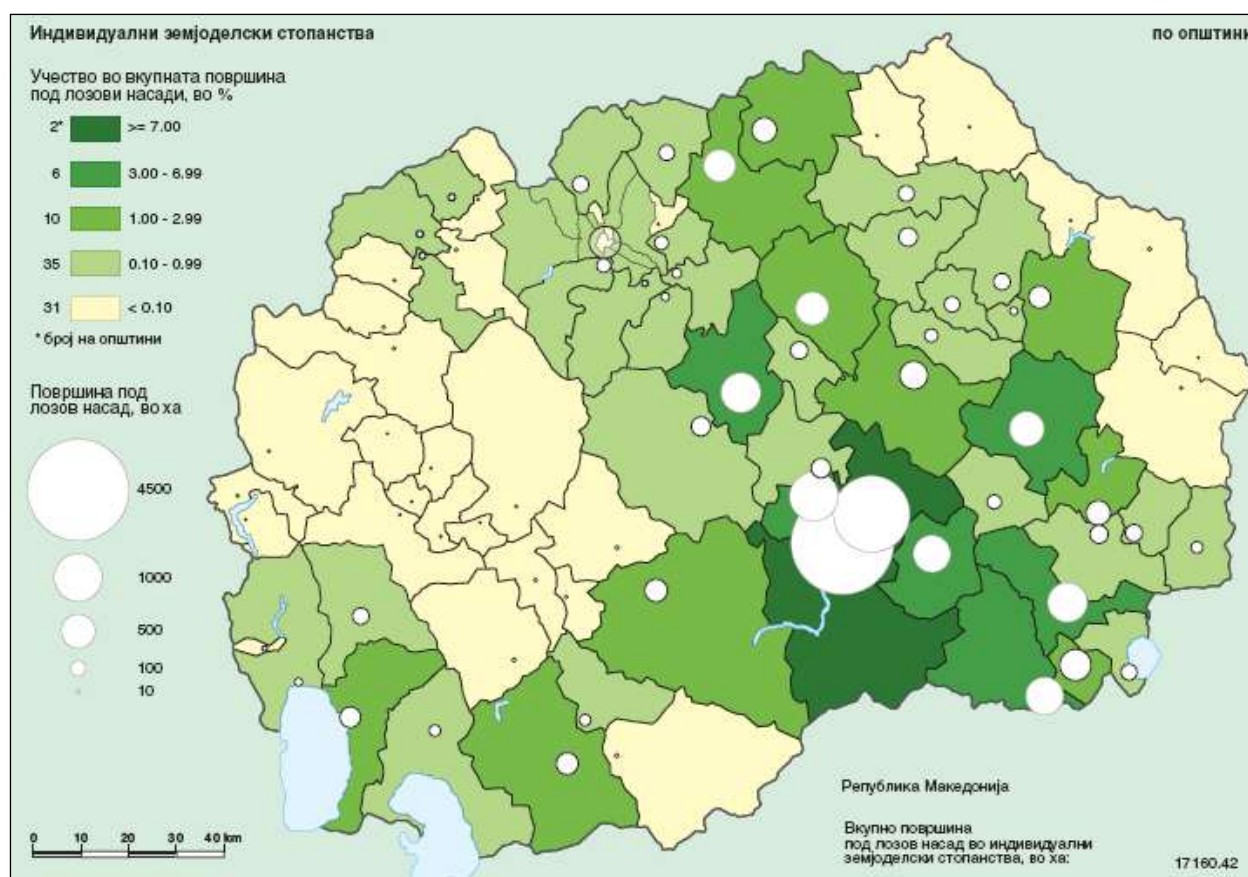
Сите три реони се карактеризираат со специфични климатско-почвени услови, кои се предуслов за избор на сортиментот при подигање на нови лозови насади.

Генерално, во Повардарскиот реон, климатско-почвените услови се погодни за одгледување на трпезни сорти и сорти за производство на црвени вина, а Пчинско–осоговски реон и Пелагониско-полошки реон за одгледување на сорти за производство на бели вина.

Во светот, вкупната површина под лозови насади изнесува 7.3 милиони ha, додека вкупното производство на грозје за 2001 година изнесувало 61,95 милиони тони.

Од целокупното произведено грозје во светот, околу 20% се користи за јадење како свежо или суво грозје, а останатите 80% се преработиваат во вино, дестилирани алкохолни пијалаци, оцет, џемови, сокови и друго (Milosavljević 1998, Avramov et al. 1999).

Виновата лоза во Македонија се одгледува на вкупна површина од 17.160.42 ha (Државен завод за статистика на Република Македонија, 2007 год), од кои 15.714.30 ha се вински и 1.446.12 ha се трпезни сорти (Слика 1). Од винските сорти, околу 60% се сорти за производство на црвени вина, а 40% за бели вина.



Слика 1. Површина под лозови насади на територијата на Република Македонија за 2007 година (карта извадена од Државен завод за статистика, 2007)

Старосната структура на лозовите насади е мошне неповолна или само 10% се со старост до 5 години; 14% се со старост од 5 до 10 години; 15% се со старост од 10 до 15 години; 23% се со старост од 15 до 20 години; 18% се со старост од 20 до 25 години и околу 20% се на старост повеќе од 25 години. Погolem дел или околу 61% од лозовите насади се постари од 15 години. Тие се со намалена продуктивност за што е потребно да се обноват со нови лозови насади, со висококвалитетни сорти на винско грозје. Исто така, неопходна е нова реонизација и климатско зонирање заради рамнотежа на екосистемот

почва-клима-подлога-сорта, со цел да се подобри квалитетот на сировините кои ги обезбедуваат сортите погодни за лозарските единици.

Од групата на сорти за производство на **црвени вина**, значајно место завземаат: *вранец, прокупец, гаме црн (gamaу noir)*, додека останатите сорти од оваа група, како што се: *каберне совинјон (cabernet sauvignon), мерло (merlot)* и *бургундец црн (pinot noir)*, последните години добиваат сè поголемо значење за производство на вина со висок квалитет и нивното ширење е сè поинтензивно.

Од сортите за производство на **бели вина**, најзастапени се: *смедеревка, жилавка, белан (grenache blanc)*, а во последно време се шират висококвалитетните сорти, како што се: *рајнски ризлинг (rheinriesling), ризлинг италијански (riesling italian), шардоне (chardonnay), совинјон бел (sauvignon blanc)* и др.

Од **трпезните сорти**, најраширени пред сè во регионот на Повардарје се сортите: *афус али, кардинал, бело зимско, мускат хамбург, рибиер* и *мускат италија*, додека останатите сорти, како што се: *шасла бела* и *црвена, јулски мускат* и *красица на лозјата* ги има во помал процент.

Вкупните површини со лозови насади од сортата *смедеревка* се околу 11.000 ха, од кои на прагот на продуктивниот живот се околу 5.000 ха. Исто така, застапеноста на сортата *вранец* е околу 7.000 ха, од кои околу 3.000 ха се постари од 25 години и треба да се обноват со нови лозови насади со сорти од кои ќе се добиваат висококвалитетни вина со познато географско потекло кои ќе бидат конкурентни на домашниот и странскиот пазар (податоци од МЗШВ на Република Македонија, ноември 2008 г.).

Во периодот 1990/97 година, во Македонија просечно се произведени 214.903 тони грозје, од кое 140.894 тони винско и 74.009 тони трпезно грозје.

Според статистиката на МЗШВ за 2006 и 2007 година, временските услови во текот на 2007 година придонеле грозјето да биде со извонреден квалитет но значително намален квантитет, поради долготрајната суша во текот на летниот период. Од страна на винарските визби биле откупени вкупно **106.640.135 kg** за 2006 г. и **113.482.980 kg** винско грозје за 2007 г., и е остварен извоз на грозје (винско и трпезно) во количина од **37.715.330 kg** или вкупен откуп и извоз во количина од **141.198.310 kg** за изминатите пет години.

На глобално ниво, светската потрошувачка на вино опаѓа, но расте потрошувачката на квалитетни и врвни вина. Моменталниот тренд во светот е барање на препознатливост на вината кои доаѓаат од различни земји, односно целта на секоја земја е да изгради свој бренд на вино по што ќе биде препознатлива.

Врвни и препознатливи вина можат да се добијат само од здрави лозови насади и квалитетни сорти, кои се типични за поднебјето каде што се одгледуваат. Македонија овде треба да ја најде шансата за пробив на светскиот пазар со своите вина. Оттука, неопходно е да им се посвети поголемо внимание на нашите локални сорти, како што е примерот на сортата *станушина*. Оваа сорта е автохтона македонска сорта, што не расте на ниедно друго место во светот, и од која, иако не е многу позната, сепак може да се добие вино со висок квалитет. Со воведувањето на интернационалните сорти грозје во Македонија, Станушината почна да исчезнува од лозјата во земјата. Но со моментната иницијатива за производство на квалитетни вина од домашни сорти грозје, се чини дека ѕвездата на Станушината повторно ќе блесне.

За постигнување на предвидените цели и следење на чекорот на современите винарски компании во светот, се залага и Владата на Република Македонија и ги субвенционира македонските лозари во зголемување на лозовите површини, со предвидување до 40.000.00 ha.

Денес во Република Македонија најзастапени сорти во сортиментот, кои го карактеризираат типот на македонските вина, се регионалните сорти, пред сè *вранец* и *смедеревка*, како и останатите кои припаѓаат на балканската подгрупа.

1.1. Патогени промени кај виновата лоза

Виновата лоза, како и секоја останата земјоделска култура, се соочува со проблеми во текот на одгледувањето, поради појавата на голем број на болести, штетници и плевели, кои нанесуваат сериозни загуби во приносот. Како резултат на истражувањата кои се правени со години наназад, природата на повеќето болести е добро проучена и постојат мерки за заштита од нив, меѓутоа кај извесни патогени промени, сузбивањето е тешко или пак природата на промените е од непознато потекло. Интензивната појава на болестите кај виновата лоза, започнала со внесувањето на дивата америчка лоза за подобро калемене, но со тоа и за прв пат дошло до внесување на болестите кај лозата од типот: пламеница предизвикана од *Plasmopora viticola* Berl & De Toni и пепелница предизвикана од *Uncinula necator* (Schw. Burr).

Денес се смета дека виновата лоза е домаќин на повеќе од 32 патогени габи, повеќе од 55 вируси и 3 бактерии (Pearson & Goheen, 1988; Martelli 2003).

Како најчести и многу слабо проучени промени кои се јавуваат на виновата лоза се „жолтилата“ односно „црвенилата“, за кои се одговорни фитоплазмите.

Потеклото на оваа група на бактериски промени кај виновата лоза долго време се сметало за вирусно, сè до седумдесеттите години од откривањето на вирусите (Saglio & Whitcomb, 1979).

Фитоплазмите за прв пат се откриени со помош на електронска микроскопија во 1967 година (Doi et al., 1967). Тоа се прокариотски микроорганизми, плеоморфни, без клеточен сид, опкружени со трислојна мембрана, со големина од 200 до 800 nm. Фитоплазмите се група на облигатни паразити кои живеат во флоемските садови на растенијата.

Фитоплазмите заедно со вирусите, кои се пренесуваат на перзистентен начин, спаѓаат во ретка група на микроорганизми кои се способни да паразитираат во растителните и животинските микроорганизми.

Најчесто предизвикуваат жолтило, заостанување во растот, абнормална пролиферација на делови од растението, како што се: листовите, стеблата, гранките, деловите од цветот (phyllody), за на крај да доведат до постепено пропаѓање на растенијата. Фитоплазмите се регистрирани како нестроги специфични патогени, затоа што често може да се сретнат и кај други растителни видови и фамилии.

Фитоплазмите предизвикуваат многу деструктивни заболувања кај виновата лоза и претставуваат проблем во современото одгледување на виновата лоза во поголемите значајни винарски центри (Франција, Италија, Шпанија), (Boudon-Padieu, 2000, Boudon-Padieu, 2003). До денес, потврдено е дека фитоплазмите се причинители на повеќе од 700 болести со различна симптоматологија на околу стотици растенија, од 98 фамилии (Weintraub & Beanland, 2006).

Појавата на жолтила кај виновата лоза можат да бидат предизвикани од фитоплазми од 7 различни рибозомални групи. До денес на виновата лоза се утврдени фитоплазми од следниве рибозомални групи: 16SrI, 16SrII, 16SrIII, 16SrV, 16SrVII, 16SrX и 16SrXII (Gibb et al., 1999; Varga et al., 2000; Boudon-Padieu, 2003). До денес, во Европа се регистрирани четири групи на фитоплазми: *Flavescence dorée* и Palatinate GY - група 16SrV, *Bois noir* или stolbur - група 16SrXII-A, apple proliferation - група 16SrX и aster yellows - група 16SrI-A (Maixner, 2006).

Фитоплазмите се идентификувани со помош на полимеразна верижна реакција (polymerase chain reaction-PCR), со амплификација со фитоплазматски генетски пражмери за 16S rRNA гени и пражмери специфични за фитоплазматската група (Lee et al. 2000).

Освен споменатата фитоплазматска секвенца (серија), се користат и други како што се: генот за издолжување – фактор – Tu (*tuf*), други рибозомални гени, 23S rDNA и 16/23S rDNA интергенски регион познат како рибозомална ДНК секвенција (низа) - (non ribosomal DNA sequences), која се користи како самостојна или во комбинација со 16S rDNA за утврдување на фитоплазматската разлика, (Gundersen et al. 1996; Smart et al. 1996; Vibio et al. 1996; Boudon-Padieu et al. 1997; Daire et al. 1997a; Schneider et al. 1997; Lee et al. 1998; Marcone et al. 2000).

Во нашата земја, до денес, фитоплазмите се многу малку или воопшто не се истражени. Според забелешки на проф. д-р Филип Пејчиновски (уснена комуникација), првите симптоми на златно жолтеење ги има забележано во 1974 година, кај сортата *бело зимско*. Подоцна, истите симптоми биле забележани кај сортите *жилавка*, *шардоне*, во околината на Неготинско, Кумановско, Струшко и Дебарска жупа. Овие констатации за присуството на жолтила кај виновата лоза, биле направени како резултат на теренската анализа на симптомите кај лозата. Лабораториски потврдувања не биле направени. Во 2001 година од страна на Митрев, С. и соработниците, извршени се првите подетални теренски и лабораториски испитувања, а подоцна и молекуларни анализи за потврдување на присуството на фитоплазмите на територијата на Република Македонија (Šeruga et al., 2003). Тогаш биле земени само две локации како цели на испитувањето, и биле испитани само две сорти на винова лоза (*шардоне* и *вранец*).

За истражувањата спроведени во текот на изработката на овој труд беа земени повеќе поголеми региони под винова лоза, со цел да се одреди присуството, видот и раширеноста на фитоплазмите кај различни сорти на винова лоза во Македонија, како и дејството на фитоплазмите врз приносот и квалитетот на грозје.

Следено е и присуството на потенцијалните вектори на фитоплазмите.

1.2. Начин на пренесување на фитоплазмите

Основна карактеристика на фитоплазмите кај виновата лоза е брзото раширување и големата економска штета, кои често доведуваат до сушење на лозите и пропаѓање на насадот.

Постојат неколку начини на пренесување на фитоплазмите: вегетативно или со калемење на заразен растителен материјал, преку пренесување на паразитски цветници од родот *Cuscuta* spp. како и со инсекти вектори од фамилијата *Cicadellidae* (цикади).

Најчесто, во природни услови фитоплазмите брзо и ефикасно се пренесуваат со помош на инсекти – вектори, цикади од редот *Homoptera* (Osler et al., 1996, Agrios, 1997, Jones, 2002).

Во оваа група спаѓаат голем број на инсекти од монофагни до полифагни, т.е. некои може да пренесуваат само една група на фитоплазмози, други можат да пренесуваат неколку групи на фитоплазмози, но постојат и такви видови кои не ги пренесуваат фитоплазмозите. Инсектите–вектори се хранат со соковите од флоемот и на тој начин пасивно ги внесуваат фитоплазмите во својот организам.

Времето коешто е потребно да помине од моментот на внесувањето на фитоплазмите до моментот на пренесување со цикадите на други здрави растенија се нарекува латентен период или период на инкубација. Зависно од временските услови, латентниот период или периодот на инкубација може да трае од неколку часа до 80 дена (Murrall et al., 1996).

Фитоплазмите кај инсектите се задржуваат во цревниот тракт, хемолимфата и плунковите жлезди. За да можат да се пренесуваат понатаму, фитоплазмите мора да се размножат во одредени специфични клетки на задниот ацинус на плунковите жлезди (Kirkpatrick, 1992). Дејството на фитоплазмите детално е проучено кај растенијата, но нема доволно сигурни податоци како влијаат фитоплазмите во телото на инсектите–вектори. Некој сеуште недоволно потврдени примери покажуваат дека фитоплазмите го зголемуваат животниот век на цикадите а кај женката *Macrostelus quadrilineatus* Forbes која во себе ја имала фитоплазмата Aster Yellow била зголемена плодноста (Beanland et al, 2000). Важно е да се напомене дека фитоплазмите неможат да се пренесат на потомството.

2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРА

2.1. Општи податоци за фитоплазмите

Фитоплазмите се предизвикувачи на повеќе од 700 различни растителни болести кај овошките, виновата лоза, како и кај некои едногодишни и повеќегодишни растенија. Како домаќини на фитоплазмите можат да бидат и голем број на плевелни растителни видови, кои се најчести извори на зараза (Martelli & Boudon-Padieu, 2006).

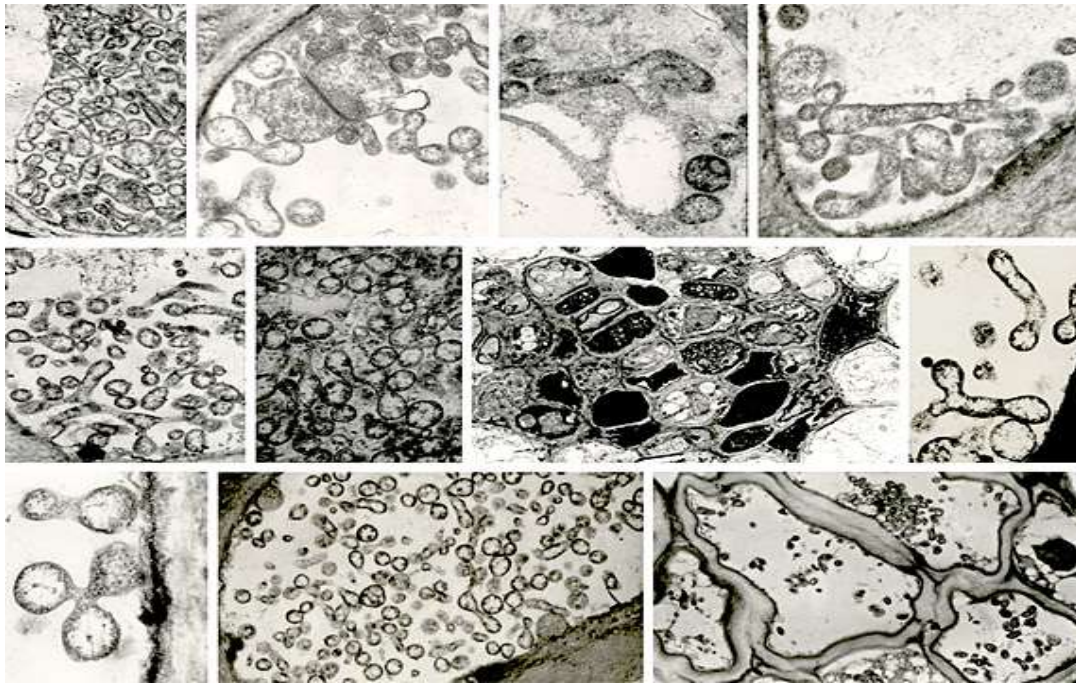
Фитоплазмите за првпат биле откриени во 1967 година и биле наречени „организми слични на микоплазмите” (*Mycoplasma-like organisms*, MLOs), сè до Интернационалната Конференција за Систематизација на Бактериите (International Organisation for Mycoplasmaology, IOM), 1996 година, (Orlando, Florida, USA), кога го добиле денешниот назив фитоплазми.

Фитоплазмите се флоемско ограничени бактерии кои ѝ припаѓаат на класата *Mollicutes*. Терминот „*phytoplasma*” дури во 1997 година го добиле називот патогени кај растенијата со привремен таксономски статус *Candidatus* (Seemüller et al., 1998).

Фитоплазмите заедно со вирусите, кои се пренесуваат на перзистентен начин, припаѓаат на ретката група на микроорганизми кои се способни да паразитираат во растителните и животинските организми. Се пренесуваат со инсекти-вектори од редот *Homoptera*.

Фитоплазмите се интрацелуларни микроорганизми, главно со округла но променлива форма и големина (50-1.000nm во пречник) и со големина на геномот од 0,5 до 1,3 Мбр, според која тие се бројуваат меѓу најмалите микроорганизми во групата на бактериите. Кај растенијата, фитоплазмите циркулираат низ ситестите плочи во ситестите цевки на флоемот, а се наоѓаат и во клетките на повеќе ткива кај инсектите-вектори (цикади). Нивниот метаболички пат и соодносот меѓу домаќините на фитоплазмите, се од голем интерес за развој на земјоделието и за полето на научниот интерес.

Изгледот на фитоплазмите на електронска микроскопија е прикажан на Слика 2.



Слика 2. Електронска микроскопија на различни модификации на флоемските садови, полиморфизам и различни димензии на фитоплазмите (слика преземена од Bertaccini A., 2007)

2.2. Градба на геномот на фитоплазмите

Фитоплазмите не можат да се одгледуваат *in vitro*, па поради тоа истражувањата на геномот на фитоплазмите е извршено со издвојување на прочистени фитоплазми изолирани од заразени растенија или инсекти вектори.

Геномот на фитоплазмите е со големина од 530 до 1.350 kbp (Niemark & Kirckpatrick, 1993, Marcone et al., 1999). Големината на геномот е варијабилна, дури и во самата група на фитоплазмите. Најмалиот геном е утврден кај два изолата на Bermuda grass white leaf phytoplasmas и тој изнесува 530 kbp. Ова не е само најмалиот геном кај фитоплазмите, туку е и најмалиот клеточен хромозом (најмал самореплицирачки геном), (Marcone et al., 1999). Најголемиот хромозом им припаѓа на фитоплазмите од групата столбур (16SrXII).

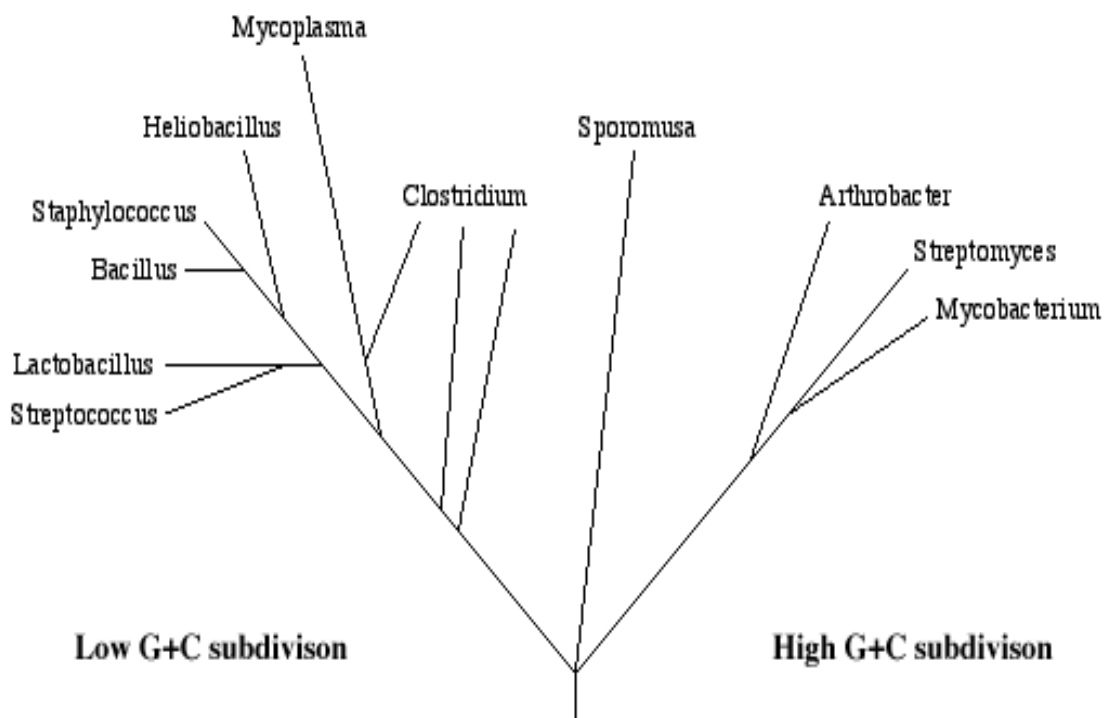
Според големината на геномот, фитоплазмите се слични со видовите од родот *Mycoplasmata* (580-1.300 kbp), но се помали од своите најблиски сродници од родот *Acholeplasma*, со големина на геном од 1.600 kbp (Razin et al., 1998).

Кај фитоплазмите е утврден недостаток на ген за синтеза на клеточниот сид, некои аминокиселини, стероли и липиди. Покрај познавањето на овие карактеристики има мал број на податоци за нивниот раст и репликација (Jones, 2002). За нив е карактеристично

што во градбата на геномот имаат пониска концентрација на G-C базни парови (Marcone et al., 1999).

Систематската припадност на фитоплазмите во однос на застапеноста на G-C парови бази е прикажана на Слика 3.

Бројот на откриените гени кај фитоплазмите постојано расте. Во 1994 година бил идентификуван генот кој ја кодира нитратната редуктаза (Jarausch et al. 1994), а во 1998 година бил идентификуван генот кој го кодира главниот протеин за фитоплазмите кој предизвикува жолтила кај астерот (Barbara et al., 1998), а во 1999 година бил идентификуван генот кој го кодира главниот протеин за фитоплазмите кој предизвикува пролиферација на јаболката (Berg et al., 1999).



Слика 3. Филогенетска припадност на фитоплазмите во зависност од застапеноста на паровите на бази (слика преземена од <http://www.mbio.ncsu.edu/MB451/lecture/firmicutes/lecture.html>)

Плазмидите и недоволно истражените екстрахромозомски елементи (1.7 - 7.0 kbp), биле пронајдени речиси кај сите фитоплазми од групата на aster yellows (жолтило на астрите) и столбур групата, и кај некој претставници од групата на X-diseases (X-болест, 16SrIII) и clover proliferation (пролиферација на детелината, 16SrVI), (Davis et al., 1988,

Harrison et al. 1991, Goodwin et al. 1994). За некој екстрахромозомски DNA, делумно се одредени и нуклеотидните секвенци (Kuske & Kirkpatrick 1990, Nakashima & Hayashi 1997, Rekab et al., 1999).

Првата хромозомска мапа на фитоплазмите била направена за фитоплазмите од групата sweet potato little leaf, кои имаат доста мал геном од 622 kb (Padovan et al., 2000). Кај оваа група на фитоплазми биле лоцирани два RNA оперони за *tus/tuf* гените кои ги кодираат G и Tu elongation (издолжувачки) фактор, *gid* генот кој ја кодира „glucose-inhibited division protein” и биле мапирани 16 рестрикциони места (цитирано од Jones, 2002).

Најголемиот број на испитувања за фитоплазмите се базирани на особините на рибозомалните гени, гени за 16S рибозомалната рибонуклеинска киселина, гени за 23S рибозомалната рибонуклеинска киселина, дел на геномот меѓу овие два гена (spaser region), гени за рибозомалниот протеин L22 и други (Seemüller et al., 1998).

2.3. Класификација на фитоплазмите

Фитоплазмите, како што е гореспоменато, не можат да се одгледуваат на хранлива подлога, што одамна го отежнувало истражувањето, а особено одредувањето на нивниот таксономски статус.

Фитоплазмите ѝ припаѓаат на класата *Mollicutes*, која има еден ред *Mycoplasmatales* со три фамилии, од кои секоја има по еден род:

- фамилијата *Mycoplasmataceae* и нејзиниот род *Mycoplasma*,
- фамилијата *Acholeplasmataceae* и нејзиниот род *Acholeplasma*,
- фамилијата *Spiroplasmataceae* со родот *Spiroplasma*.

Фитоплазмите се морфолошки најблиску до родовите *Mycoplasma* и *Acholeplasma*, додека по генетските карактеристики се најблиску до родот *Acholeplasma* (Agrios, 1997) (Слика 3).

Првичното мислење за настанувањето на класата *Mollicutes* било дека тие настанале од различни Грам-позитивни бактерии, (Neimark, 1986), но подоцна било поставено друго тврдење дека оваа класа настанала од еден предок на Грам-позитивните

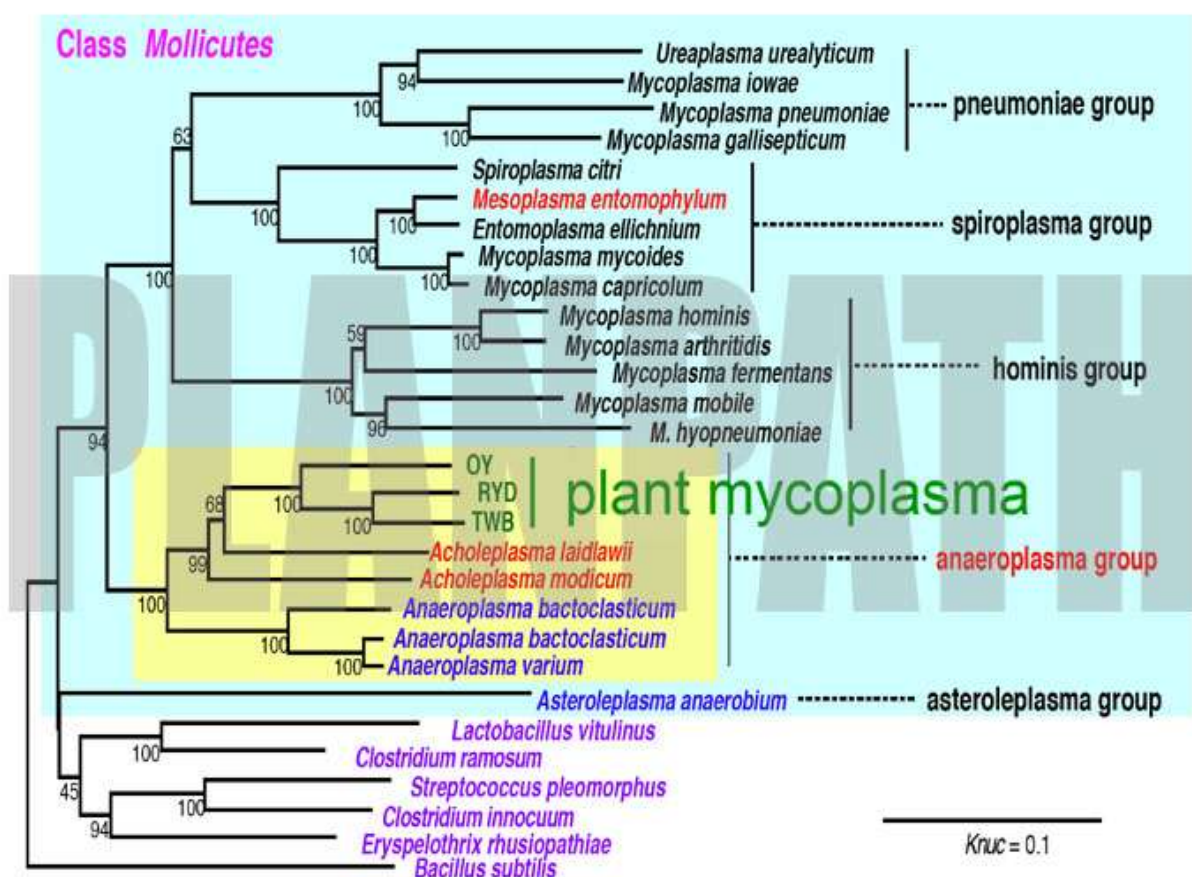
бактерии од лактобацилусна линија, кои во својот геном имале пониска содржина на G-C паровите на бази (Woese, 1987).

Во текот на еволуцијата најверојатно дошло до губење на генот чии продукти се вклучени во процесот на синтеза на клеточниот сид, аминокиселините, витамините и масните киселини. Се претпоставува дека редукцијата на геномот на фитоплазмите поради губењето на споменатиот ген е тесно поврзана со неможноста за одгледување на фитоплазмите на хранлив медиум.

Диференцијацијата и класификацијата на претставниците од класата *Mollicutes* кои можат да се одгледуваат на хранлива подлога е базирана на фенотипските и генотипските карактеристики. Во почетокот за класификацијата на фитоплазмите биле користени само симптоматологијата, домаќинот и географската распространетост на фитоплазмите (австралиско жолтило кај виновата лоза, европско жолтило кај костенилковите овошки, италијанско жолтило кај зелката). Важна улога при ваквиот вид на класификација имало растението *Cataranthus roseus*, на кое се пренесени многу фитоплазми и кое реагира со специфични симптоми од фитоплазматска зараза (Marwitz, 1990). Неговата класификација покажува големи сличности со денешната генетска класификација.

Денешните испитувања на видовите од класата *Mollicutes*, покажаа дека таа претставува добар шаблон за генетско секвенционирање, поради малиот геном и економската важност на оваа класа кај растителните болести.

До денес, 16 геноми од класата *Mollicutes*, се комплетно секвенционирани (<http://cbi.labri.fr/outils/molligen/home.php>), вклучувајќи две фитоплазми од групата *Candidatus*, "*Ca. P. asteris*" (OY-M и AY-WB) (цитирано кај Nguyen et al., 2007).



Слика 4. Поделба во внатрешноста на класата *Mollicutes* (слика преземена од <http://papilio.ab.a.u-tokyo.ac.jp/planpath/phyto-genome/index.html>)

Современата класификација на фитоплазмите е генетската класификација која се базира на секвенците на одреден дел на генот. Така, во 1994 година во Бордо и во 1996 година во Орландо работел цел тим на проблематиката со фитоплазмите, кои преку меѓународна истражувачка програма за споредбена микоплазматологија (International Research Programme of Comparative Mycoplasmaology, IRPCM) и меѓународна класификација за микоплазматологија (International organisation for Mycoplasmaology, IOM), ја прифатиле новата класификација на фитоплазмите, базирана на секвенцата на генот за рибозомалната рибонуклеинска киселина (16S rRNA ген). Подкомитетот за таксономија на моликутите и Меѓународниот комитет за систематика на бактериите (International Committee of Systematic Bacteriology, ICSB), во 1993 и 1997 година, прифатиле класификацијата на фитоплазмите да биде базирана на филогенијата (Seemüller et al., 1998).

Секвенционалната анализа на 16S rRNA генот е стандардна метода за филогенетска класификација на прокариотите. Врз основа на оваа анализа, во почетокот биле

формирани 12 групи, а до денес се формирани вкупно 15 групи на фитоплазми (Seemüller et al., 1998).

Освен оваа генетска секвенца, биле користени и други делови од геномот на фитоплазмите за нивна класификација. Делот на геномот помеѓу 16S и 23 Sr RNA генот е помалку конзервативен регион од 16S rRNA генот, но се користи при класификацијата, затоа што овој геном е пократок и полесен за секвенционирање (Seemüller et al., 1998).

Освен овие покарактеристични геномски структури за класификацијата на фитоплазмите, Martini и сораб. (1999) и Angelini и сораб. (2001) користеле помалку конзервативни нерибозомални ДНК фрагменти, *SecY* генот и дел од *rpl5* генот за формирање на подгрупи во состав на *Flavescence doreé* фитоплазмите.

Врз основа на 16S rDNA генот е направена класификација на фитоплазмите во 15 групи, кои носат тривијално име и шифра од 16SrI до 16SrXV, и повеќе од 40 подгрупи (Lee et al., 2000, Montano et al., 2001):

1. Aster yellows group (16SrI) - жолтило на астрите;
2. Peanut witches'-broom (16SrII) - вештеркини метли кај кикиритките;
3. X-disease (16SrIII) - X-болест;
4. Coconut lethal yellows (16SrIV) - жолтило кај кокосот;
5. Elm yellows (16SrV) - жолтило на брестот;
6. Clover proliferation (16SrVI) - пролиферација на детелината;
7. Ash yellows (16SrVII) - жолтици на јасенот;
8. Loofah witches'- broom (16SrVIII) - вештеркини метли кај краставицата;
9. Pigeon pea witches'-broom (16SrIX) - вештеркини метли кај зрната грашок;
10. Apple proliferation (16SrX) - пролиферација на јаболката;
11. Rice yellow draft (16SrXI) - жолтило кај оризот;
12. Stolbur (16SrXII) - столбур фитоплазма;
13. Mexican periwinkle virescence (16SrXIII) - мексиканско зеленило;
14. Bermuda grass white leaf (16SrXIV) - бели листови кај троскотот;
15. [Hibiscus witches'-broom](#) (16SrXV) - вештеркини метли кај хибискусот.

2.4. Проучување на фитоплазматските болести кај виновата лоза во светот

Болестите кои се појавуваат кај виновата лоза можат да бидат предизвикани од повеќе групи на фитоплазми. Сите фитоплазми кај виновата лоза предизвикуваат идентични или слични симптоми, врз основа на кои не можат да се разликуваат и затоа тој синдром е наречен под едно име „жолтила кај виновата лоза“ ("*grapevine yellows*", GY) (Daire et al., 1993, Bertaccini et al., 1995, Boudon-Padieu, 2000, Angelini et al., 2001).

Најкарактеристичните симптоми за присуството на фитоплазмите кај виновата лоза можат да се забележат во рана есен, кога доаѓа до промена и заболување кај листовите. Болните растенија покажуваат промени во бојата на листовите, што зависи од сортата на лоза. Кај белите сорти доаѓа до пожолтување на листовите, а кај црвените сорти доаѓа до црвенила по листовите. Листовите стануваат крути и доаѓа до нивно свиткување навнатре, а на тој начин добиваат триаголен изглед. Кај болните растенија е забележано подоцнежено опаѓање на заболените листови. Кај ластарите доаѓа до намалување на лигнификацијата, поради што тие лесно се свиткуваат. Подоцна може да се појави и некроза на врвните или страничните пупки. Нелигнифицираните ластари во текот на зимата потемнуваат и пропаѓаат, додека подоцна заразените ластари можат да презимат, но напролет потеруваат побавно (Smith et al., 1997).

Во рана есен, во септември, освен за проучување на симптомите, се препорачува и како најдобро време за земање на примероци од виновата лоза за детекција на фитоплазмите (Škoric et al., 1998).

Како најкарактеристични симптоми на жолтилата кај виновата лоза можат да се набројат следниве: витки на листовите, промена на бојата - пожолтување и поцрвенување во зависност од сортата, намалување или потполно отсуство на лигнификацијата на ластарите и сушење на гроздовите (Boudon-Padieu, 2003).

Жолтилата кај виновата лоза можат да бидат предизвикани од фитоплазми од 7 различни групи. До денес кај виновата лоза се утврдени фитоплазми од групите: 16SrI, 16SrII, 16SrIII, 16SrIV, 16SrV, 16SrVII, 16SrX и 16SrXII (Gibb et al, 1999, Varga et al., 2000, Boudon-Padieu, 2003).

Во Европа, најважни групи на фитоплазми се: *Flavescence dorée* (FD), до денес откриена во Франција, Италија, Шпанија, Португалија, со која се поврзани фитоплазмите од 16SrV групата и *Bois noir* (BN) со кој се поврзани фитоплазмите од групата 16SrXII (подгрупа столбур), а оваа група е откриена речиси во сите европски земји (Франција,

Германија, Италија, Швајцарија, Шпанија, Хрватска, Словенија) и некои азиски земји (Израел и Либан), (Osler et al., 1996, Varga et al., 2000, Boudon-Padieu, 2003).

2.5. *Flavescence dorée* (златно жолтило)

Таксономска позиција: *Bacteria; Tenericutes; Mollicutes; Phytoplasmas*

Најчесто користено име на оваа фитоплазма е *Grapevine Flavescence dorée phytoplasma*. Отанати имиња кои се употребуваат во светот се: *Baco 22A diseases* (Англија), *Flavescence dorée* (Франција), *Flavescencia dorada* (Шпанија), *Flavescenza dorata* (Италија) (EPPO quarantine pest).

Болеста предизвикана од *Flavescence dorée* (FD) за првпат е забележана и опишана во 1956 година, во југозападна Франција, од каде почнува да се проширува во другите подрачја (Caudwell, 1957; Pearson & Goheen, 1988). Во почетокот се мислело дека болеста е од вирусно потекло. Понатамошните испитувања покажале дека болеста се шири со помош на инсекти-вектори, со цикадите од видот *Scaphoideus titanus* Ball, и тогаш првпат била дефинирана како болест која се пренесува со помош на *Scaphoideus titanus*. Тие презимуваат во стадиум на јајце, а имаат пет ларвени стадиуми. Имагото, како и останатите ларвени стадиуми, се храни на внатрешната страна на листовите од виновата лоза, вшмукувајќи ја содржината од фломот. Од оваа група на инсекти, речиси и нема некоја директна штета, тие имаат само една генерација годишно (Cravedi & Aldini, 2000; Posenato et al., 2001).

Flavescence dorée (FD) е карантинска болест кај виновата лоза и се смета за една од најзначајните жолтила. Се пренесува единствено со векторот *Scaphoideus titanus*, кој живее и се храни единствено на виновата лоза и ја пренесува болеста од една на друга лозанка (Davis & Dally, 2001, Boudon-Padieu, 2003).

Flavescence dorée е карантинска болест во земјите каде таа е одамна потврдена. Во Франција се спроведени мерки за контрола од 1987 година, а во Италија од 2000 година. Денес, нејзиното присуство е евидентирано во сите поголеми винарски региони во светот, како што се: Франција, Италија, Шпанија, Словенија и Србија (Avramov Z., 2008).

Покрај тоа што фитоплазмите кои се поврзани со *Flavescence dorée* ѝ припаѓаат на групата 16SrV, помеѓу нив има одредени разлики на молекуларно ниво. Врз основа на таа разлика во секвенцата на 16Sr DNA регионот, поделени се во две подгрупи: 16SrV-C (FD-C) и 16SrV-D (FD-D) (Bertaccini et al., 1997, Martini et al., 1999).

Доколку се земат предвид и некои варијабилни региони на ДНК кај фитоплазмите, тогаш можат да се разликуваат и повеќе подгрупи во состав на 16SrV групата. Врз основа на анализите кои се направени на SecY генот и генот на рибозомалниот протеин rpS3, FD е поделен на четири подгрупи (Martini et al., 2002).

2.6. Bois noir (црно дрво)

Таксономска позиција: *Bacteria, Tenericutes, Mollicutes, Phytoplasmas*

Најчесто користено име на оваа фитоплазма е *Grapevine Bois noir phytoplasma* (EPPO quarantine pest). Останати имиња кои се употребуваат во светот се: *Vergilbungskrankheit* (Германија), *Legno nero* (Италија), *Bois noir* (Франција), *Black wood* (Англија) (Boudon-Padieu, 2003; EPPO quarantine pest).

Оваа болест за првпат била опишана во Франција. Подоцна било утврдено дека предизвикувачот на оваа болест е од групата на фитоплазмите, а денес се знае дека нејзиниот предизвикувач е фитоплазмата од подгрупата столбур (16SrXII-A).

Покрај различните имиња на оваа фитоплазма, *Bois noir*, *Vergilbungskrankheit* и *Legno nero* многу малку се разликуваат.

Како примарни домаќини на оваа фитоплазма се плевелните растенија: *Convolvulus arvensis* и *Urtica dioica*, кои претставуваат природен резервоар на фитоплазмата столбур.

До денес, единствен познат вектор на овие фитоплазми кај виновата лоза е цикадата *Hyalestes obsoletus* Signoret (Boudon-Padieu, 2003).

Оваа цикада е широко распространета во Европа и Средниот Исток, и е причинител на индиректни штети кај виновата лоза, поради тоа што живее и се храни на околната вегетација, а повремено преминува и на виновата лоза, која е последен домаќин во синцирот на домаќини и ја врши инфекцијата (Maixner, 1994).

За разлика од *Scaphoideus titanus*, кој директно предизвикува штети кај виновата лоза со пренесување на фитоплазмите од една лозанка на друга, *Hyalestes obsoletus* пренесувањето го врши од околната вегетација на виновата лоза.

Фитоплазмата *Bois noir* е раширена во сите европски земји, како и во Мала Азија (Boudon-Padieu, 2003).

2.7. Други групи на жолтила кај виновата лоза

Покрај *Flavescence dorée* и *Bois noir*, кај виновата лоза можат да се јават и други болести предизвикани од фитоплазмите. Останатите групи на фитоплазми кај виновата лоза кои со сигурност се присутни и потврдени во Европа, се следниве:

- Palatinate Grapevine Yellows – оваа болест е откриена и е присутна во Германија. Со неа се поврзани фитоплазмите од групата *Elm yellows*. Фитоплазмите поврзани со оваа болест се наоѓаат во иста група со фитоплазмите FD. Сепак, оваа болест е различна од FD, па затоа е посебно класифицирана. Вектор на оваа фитопlasма е цикадата *Oncopsis alni* (Maixner et al., 2000);
- Aster yellows – фитоплазмите од оваа група се пронајдени кај виновата лоза во Италија (Boudon-Padieu, 2003);
- European stone fruit yellows – фитоплазмите од подгрупата 16SrX-C, за првпат биле потврдени на виновата лоза во Унгарија (Varga et al., 2000).

Кај виновата лоза во светот се појавиле и други типови на жолтила, како што се:

- Australian grapevine yellows – оваа болест е присутна во Австралија, а со оваа група се поврзани фитоплазмите од столбур 16SrXII-B подгрупата или со Tomato big bud фитоплазмите од 16SrII групата (Boudon-Padieu, 2003);
- Buckland valley grapevine yellows – оваа болест е присутна во долината Buckland, во Австралија, а од таму го добила и своето име. Со неа се поврзани фитоплазмите од групата 16SrI (Boudon-Padieu, 2003);
- North-American grapevine yellows – оваа болест е присутна во САД, во државите Њујорк и Вирџинија, а со неа се поврзани фитоплазмите од X-disease, подгрупа 16SrIII-I (Boudon-Padieu, 2003);
- Ash yellows – нова болест кај виновата лоза детектирана во Чиле во 2003 година, со која се поврзани фитоплазмите од групата 16SrXII (Gajardo et al., 2003).

2.8. Проучување и познавање на жолтилото кај виновата лоза во Република Македонија

Првите симптоми на жолтила кај виновата лоза за првпат биле забележани кон крајот на седумдесеттите години, во некои региони под винова лоза во Република Македонија. Истражувањата на фитоплазмите на територијата на Република Македонија започнале релативно доцна, во однос на познавањето на дијагностиката и распространувањето на фитоплазмите во светот.

Во првите години на XXI век биле објавени првите податоци за новите патогени промени кај виновата лоза (Митрев и сор., 2001). Неколку години подоцна, од страна на Митрев и соработниците, биле извршени првите подетални теренски и лабораториски (молекуларни) анализи за потврдување на присуството на фитоплазмите на територијата на Република Македонија. Тогаш биле земени само две територии како цели на испитување и со помош на полимеразна верижна реакција (PCR - Polimerase chain reaction) и со анализа на полиморфизмот на рестрикциските фрагменти (RFLP – Restriction fragment lenght polimorphisam), било докажано присуството на фитоплазмите од столбур групата, подгрупа 16SrXII-A, на сортите *шардоне* и *вранец* во околината на Скопје и Велес (Šeruga et al., 2003). Ова истражување претставува еден чекор напред во науката за фитоплазмите, но било направено на ограничени региони под винова лоза и само на две сорти на територијата на Република Македонија, сè со цел да се потврдат првичните симптоматолошки податоци за присуството на фитоплазмите на нашата територија.

Кај поголемите региони под винова лоза, како што се: Кавадарци, Неготино, Струмица, Куманово, Радовиш, Штип и Велес, каде што се одгледуваат трпезни и вински сорти на грозје, до ова поголемо истражување не беа познати податоци за појавата и постоењето на промени од типот на жолтила.

Сериозноста на проблемот со фитоплазмите, нивната појава во нашите виноградарски региони, раширувањето и штетите кои ги предизвикуваат не насочија кон детално проучување на симптоматологијата и експериментално докажување на видот на фитоплазмите со примена на молекуларни методи.

2.9. Економско значење на фитоплазмите кај виновата лоза

Болестите од типот на жолтила кај виновата лоза значајно делуваат на приносот на грозје, а сериозно го намалуваат и квалитетот на виното. Одржувањето на причинителите на болеста во растителниот материјал во тек на мирување на вегетацијата и нивно пренесување со инсекти-вектори, цикади, се главните елементи кои го отежнуваат спречувањето на болеста. Присуството и ширењето на жолтилата, зависи од присутните вектори во лозовиот регион. Меѓутоа, постојат жолтила за кои сè уште не се евидентирани векторите за нивното распространување (Martelli and Boudon-Padieu, 2006).

Заболените лози од фитоплазмите остануваат трајно заразени. Меѓутоа, со текот на времето симптомите можат да заслабнат или да бидат маскирани. Потполно здравување и отстранување на симптомите било забележано кај слабо и средно осетливите сорти на винова лоза (Osler et al., 1993).

Најновите истражувања за отпорноста и отстранувањето на симптомите и здравувањето на лозовите насади се базираат на активирање на одредени физиолошки процеси, кои се со одбранбен карактер (Osler et al., 2003; Musetti et al., 2006).

Не постои класичен метод за лекување на заболените лозови насади од фитоплазмите. Отстранувањето на заболените ластари и калемењето се бескорисни методи, затоа што коренот и стеблото остануваат инфицирани. Контролата на жолтилата кај виновата лоза, пред сè, зависи од производството и користењето на здрав посадочен материјал, познавањето на инсектите-вектори, можноста за нивно сузбивање, спречувањето на нивното мигрирање на пошироки региони под винова лоза, како и идентификацијата на резервоарите (депоата) на инокулумите, како што се инфицираните лозови насади, плевели или друга вегетација, односно други засадени култури.

Третирањето на растенијата со антибиотици од групата на тетрациклините (на кои се осетливи фитоплазмите), се користело во дијагностички цели, но многу ретко како заштитна мерка (Jones, 2002).

Потопувањето на садниот материјал, во фаза на мирување, пред или по калемењето во топла вода (Hot water treatment – HWT) се покажало дека дава одредени резултати во лечењето на фитоплазмозите кај виновата лоза.

Се препорачува различна комбинација на температура на водата и должината на траењето на потопувањето, но температурата да не биде пониска од 50°C и временскиот период да не е пократок од 30 минути (Caudwell, 1996 цитат во Martelli & Boudon-Padieu,

2006; Moretti & Anaclerio, 2000; Bertaccini et al, 2003; Crocker et al, 2003; Tassart-Subirats et al., 2003).

Присуството на векторите на фитоплазмите кај виновата лоза покажува на фактот дека фитоплазмите се веќе присутни во лозовите насади или пак дека наскоро ќе бидат присутни. Уништувањето на популацијата на векторите во лозовите насади е многу важна мерка при намалувањето на инфективниот потенцијал на болеста. Уништувањето на векторите се одвива преку примена на хемиски третмани, а во последните години се испитува можноста за примена на природните инсектициди и непријатели (Boudon-Padieu, 1999).

Во секој случај, најважен фактор за превентива на лозовите региони е подигање на лозови насади со здрав и сертифициран посадочен материјал, ограничување на популацијата на векторите и спречување на нивните активности.

3. ЦЕЛ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО

Фитоплазмите се значајна група на заболувања кај виновата лоза, кои се многу малку проучени на територијата на Република Македонија. Како резултат на познавањата на карактеристиките на фитоплазмите во светот, и недоволната проученост кај нас, се наметна потребата да се даде поголем акцент во истражувањата на фитоплазмите кај нас.

Истражувањата на фитоплазмите во рамките на овој магистерски труд ќе овозможат подобро запознавање на симптомите, степенот на раширеност на фитоплазмите низ лозовите насади во Македонија, нивната штетност, како и постоење на можните вектори за нивно проширување.

Главните цели на ова истражување беа дизајнирани на овој начин:

- ✓ Теренски да се определат вистинските симптоми предизвикани од фитоплазмите;
- ✓ Маркирање, колекционирање и запишување на состојбата на терен (% на инфекција на површините);
- ✓ Експериментално, со примена на PCR-RFLP молекуларните методи, да се овозможи брза, сензитивна и специфична детекција и типизација на фитоплазмите, со многу мало количество на почетна ДНК;
- ✓ Определување на вкупниот процент на инфекција на терен, како и одредување на можностите за раширување на фитоплазмите во тек на двегодишното истражување;
- ✓ Определување на видот на фитоплазмите и споредување на фитоплазмите присутни кај нашите најблиски соседи, се со цел да се направи корелација за појавата на фитоплазмите кај нас.

Резултатите кои се очекуваат од ова истражување во рамките на магистерскиот труд, ќе ни овозможат поголеми сознанија за фитоплазмите и оформување на една слика за оваа помалку позната група на заболувања кај виновата лоза.

На овој начин ќе се создаде основа за разработување на адекватни мерки за заштита на виновата лоза од фитоплазмите во наши услови.

Со добивањето на овие резултати ќе се отворат и бројни прашања за понатамошни испитувања во рамките на оваа област.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД НА РАБОТА

4.1. Досегашни користени методи за идентификација на фитоплазмите

Во минатото, фитоплазмите долг временски период се идентификувале на база на симптомите, употребата на светлосна и електронска микроскопија, и со употреба на серолошки методи. Во последно време, како резултат на развојот на нови молекуларни методи, сите овие претходно наброени техники се заменети и се помалку сè употребуваат (Osler et al., 1996; Jones, 2002).

Фитоплазмите предизвикуваат појава на неспецифични симптоми (жолтила, хлороза, свиткување на листовите и овенување на лозата), како и многу специфични симптоми (виресценција, филодии, како и појава на „вештеркини метли“) (Osler et al., 1996). Симптоматологијата не е доволна за прецизна детекција на причинителот на болеста, и најчесто врз основа на симптомите може да се претпостави дека заболувањето е од фитоплазматска природа (Osler et al., 1996).

Doi и сораб., во 1967 година, за првпат ги забележале фитоплазмите на електронска микроскопија во флоемското ткиво кај заразените растенија и кај инсектите вектори (цитат по Boudon-Padieu, 2000). Електронската микроскопија покажала дека фитоплазмите се, главно, со сличен облик и дека не можат да се разликуваат врз основа на морфологијата (Jones, 2002).

Воочувањето на фитоплазмите во спроводните садови со електронска микроскопија, бил првиот чекор во детекцијата на фитоплазмите, но овој метод не бил едноставен и брз, па затоа не можел да се користи за рутинска дијагностика (Jones, 2002).

Присуството на фитоплазмите во заразените растителни ткива, може да се набљудува под светлосен микроскоп со флуоресцентно боење на ДНК со специфична боја, 4,6 диамино-2-фенилиндол (DAPI), специфична боја-калоза, боење со анилинско сино или боење со т.н. „Даинова“ боја (Agrios, 1997).

Хемотерапијата претставувла стандардна постапка за детекција на присутните фитоплазми кај растенијата, дури и во случај кога нивното присуство не било детектирано со помош на електронска микроскопија (Fox, 1993).

Повлекувањето на симптомите под дејство на тетрациклините и некои други антибиотици од групата на хлорамфениколите е уште една дијагностичка карактеристика за присуството на фитоплазмите. Степенот на повлекување на симптомите зависи, пред сè,

од начинот на примена на антибиотиците и од степенот на инфекција во моментот на примена. Типични методи за апликација на антибиотиците се прскање на растенијата, потопување на коренот во раствор, заливање и инјектирање на стеблата. Во секој случај, било потврдено дека симптомите повторно се појавуваат („reemission”) кога ќе престане дејството на антибиотикот.

Третирањето на растенијата со антибиотици се користело во дијагностички цели, но многу ретко и како метода за борба против овие болести. Еден таков пример за употреба на антибиотици како мерки за заштита е третирање на фитоплазматско симптоматичните декоративни палми во градовите на Јужна Флорида (Jones, 2002).

Серолошките методи биле применувани за рутинско докажување на прокариотските микроорганизми, кои можат да се одгледуваат на хранлива подлога. Но кај фитоплазмите се појавил проблем на добивање на специфични поликлонални антитела, поради проблемите кои настанале во прочистувањето на фитоплазмите (Jones, 2002).

Имуногените се екстрахирани од заразените растенија и на овој начин добиените антисеруми покажале многу неспецифична реакција со растителните антигени. Антисерумите произведени од екстрахираните фитоплазми од заразените инсекти-вектори биле многу ретки. Проблемите при прочистувањето на фитоплазмите, нивната ниска концентрација и нерамномерната распределеност кај заразените растенија, дејствувале на произведувањето на специфичните антисеруми со тоа што го отежнувале нивното создавање. На тој начин, поголем број антисеруми кои се произведени од фитоплазмите се добиваат од заразените растенија кај кои концентрацијата на фитоплазмите е многу голема. На овој начин се добиени антисеруми од *Catharantus roseus*. Со помош на добиените антитела можеле да се детектираат само фитоплазмите кои се наоѓаат во голема концентрација (Seemüller et al., 1998).

Поликлонални и моноклонални антитела биле произведени за голем број на фитоплазми (Seemüller et al., 1998). Според Lee и Davis (1992), поликлоналните антитела можеле да разликуваат оддалечени групи на фитоплазми, додека моноклоналните биле многу специфични и можеле да разликуваат само блиски соеви од фитоплазми (цитирано според Jones, 2002).

Покрај потешкотиите во испитувањата, се развиле и серолошките методи за докажување на фитоплазмите. Најчесто користени методи се: ELISA тест, „tissue blot”,

имуноелектронска микроскопија, дот-блот метода и имунофлуоресценција (Sinha & Benhamou, 1983; Chen et al., 1993).

Покрај развојот на сите методи, во последната деценија развојот на молекуларните методи ги потиснува сите останати методи поради својата голема осетливост. Карактеризацијата на детектирањето на фитоплазмите може да биде направена само со молекуларни техники (Boudon-Padieu, 2000; Jones, 2002).

4.1.1. Молекуларни методи за детекција на фитоплазмите

Молекуларни методи кои се најчесто користени во идентификацијата на фитоплазмите се: ДНК хибридизација, користење на случајно клонирани фрагменти на фитоплазматската хромозомска ДНК екстрахирана од растенијата, која овозможила точна и специфична детекција на фитоплазмите кај заразените растенија и инфицираните вектори (Jones, 2002). ДНК хибридизација е најосетлива метода во споредба со останатите серолошки методи, и може да го одреди присуството на фитоплазмите и покрај тоа што тие се присутни во многу ниска концентрација во растителните клетки.

И покрај специфичноста и точноста на оваа метода, во последно време е потисната со развојот на полимеразна верижната реакција (Polymerase Chain Reaction-PCR) (Jones, 2002).

4.1.2. Метода на полимеразна верижна реакција (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Методата на полимеразна верижната реакција (PCR Polymerase Chain Reaction) е метода на селективно *in vitro* умножување на ДНК секвенците и подразбира умножување на фрагментите на ДНК низ циклуси на повторување на топлотна денатурација на ДНК и синтеза на нови верижни молекули со користење на термостабилна *Taq* полимераза (ензим изолиран од термофилната бактерија *Thermus aquaticus* (Stevanovič & Arsič, 1997).

PCR-от бил осмислен од страна на Kary Mullis во 1983 година и за ова откритие, десет години подоцна, добил Нобелова награда. Оваа метода отворила ново поле на истражување во фундаменталната наука. Весникот „*Science*” во 1989 година ја избрал PCR

методата како „главно достигнување во научниот развој“, а додека *Taq* полимеразата – ензимот кој ја катализира оваа реакција бил избран за „молекул на годината“.

Предноста на PCR-от во однос на сите останати техники кои биле користени пред него е тоа што работи со минимална количина на почетен материјал и овозможува амплификација на саканите сегменти на ДНК молекулот до милијарда пати, што е и повеќе од доволно за понатамошни анализи. Високата осетливост на PCR реакцијата овозможува анализа на ДНК изолирана само од една единствена клетка.

Основниот принцип на PCR амплификацијата на однапред предодреден сегмент од ДНК молекулот, всушност претставува имитација на репликација на ДНК, процес кој нормално се одвива во сите живи организми. Репликацијата на ДНК молекулот е процес во кој од еден молекул на ДНК се добиваат два нови идентични молекула (Romas et al., 1999).

За една репликација на ДНК е потребно:

- 1.) **ДНК матрица (матична ДНК)** - двоверижна ДНК која ја содржи секвенцата која треба да се амплифицира;
- 2.) **пар на специфични прајмери** – кратки едноверижни олигонуклеотидни комплементарни краеви од секвенцата која се копира;
- 3.) **нуклеотиди** – смеса на трифосфатни форми на четирите деоксирибонуклеотиди (dATP, dGTP, dCTP и dTTP), познати како „dNTPs“, кои се неопходни градивни единици за синтеза на ДНК;
- 4.) **ензим - ДНК полимераза** – зависна ДНК полимераза, ензим изолиран од терморезистентната археобактерија *Thermus aquaticus*, чиј температурен оптимум е меѓу 70 и 80°C.

PCR реакцијата се одвива во микротубици (со содржина од 0,2 до 1,5 ml), каде ДНК се подложува на прецизни циклични промени на температурата која има за цел амплификација на точно одредениот ген или само дел од генот до милион или милијарда пати (Romas et al., 1999).

За да се овозможи селективно умножување, потребно е да постојат податоци за нуклеотидната секвенца на главниот сегмент (сегментот што се умножува). Со тоа се овозможува конструкција на двата олигонуклеотидни прајмера, со големина од 15 до 30 нуклеотиди кои ја ограничуваат секвенцата која се амплифицира. Кога прајмерите ќе се

додадат на амплифицираната ДНК, тие специфично се врзуваат за комплементарната секвенца, ограничувајќи го главниот регион. Прајмерите се конструирани на тој начин што во присуство на термостабилна ДНК полимераза и прекурсори (дезоксирибонуклеозид трифосфатази - нуклеотиди, dNTP-s) може да се започне синтезата на новите вериги.

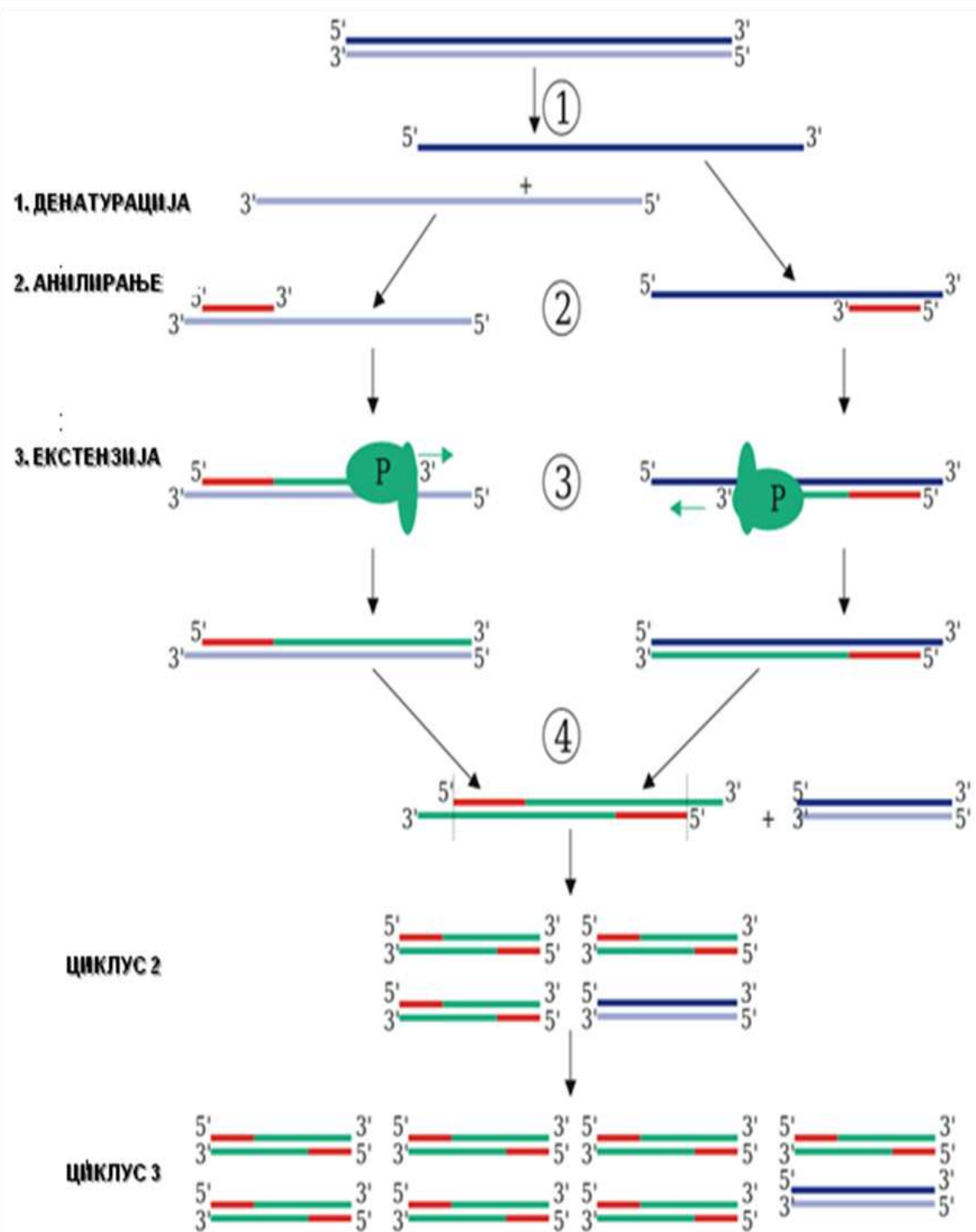
Поради тоа што прајмерите се врзуваат и за новосинтетизираните вериги, во секој циклус се зголемува бројот на матричните молекули, што доведува до нивна експоненцијална акумулација. По 30 до 35 циклуси на синтеза на ДНК ќе бидат синтетизирани 10^9 копии од одбраната секвенца. Таа количина е доволна продуктот по умножувањето да се види како лента која одговара на соодветната големина на агарозниот и полиакриламидниот гел (Stevanović & Arsić, 1997).

Еден циклус на PCR реакцијата се состои од три чекори:

- 1) **денатурација на ДНК матрицата** (раскинување на водородните врски помеѓу двете комплементарни ДНК вериги, под дејство на температурата);
- 2) **анилирање – хибридизација на прајмерите со матрицата** (воспоставување на водородни врски помеѓу прајмерите и комплементарните секвенци на матрицата);
- 3) **екстензија (елонгација, издолжување) на прајмерите** (катализирана ДНК полимераза).

Шематскиот приказ на PCR реакцијата е даден на Слика 5.

За да можат да се видат умножените продукти од PCR реакцијата е потребно тие да се раздвојат и обојат. Раздвојувањето се врши со електрофореза во агарозен или полиакриламиден гел, а боењето се врши со етидиум бромид или сребрен нитрат. Најчесто при боењето се користи етидиум бромид кој е видлив под UV светлост (Newton & Graham, 1994).



Слика 5. Приказ на PCR реакцијата

4.1.3. Вгнезден PCR (*Nested PCR*)

Вгнездениот или *nested PCR* е двофазен PCR во кој продуктите од амплификацијата од првиот PCR (прва фаза) се користат како матрица за умножување на малиот дел од ампликонот, со помош на друга група на прајмери. Другата група на прајмери е комплементарна на секвенцата внатре во првиот ампликон (Romas et al., 1999). *Nested PCR*-от е над 100 пати поосетлив од обичниот PCR (Jones, 2002).

Постојат голем број на примери каде присуството на фитоплазмите не можело да се утврди со директниот PCR, а се потврдило со вгнездениот или *nested PCR* (Batle et al. 2000; Šeruga et al. 2000).

4.1.4. PCR метода во детекција на фитоплазмите

Амплификацијата на 16S rDNA генот на фитоплазмите со помош на осетливата PCR метода обезбедила многу прецизна детекција и идентификација во однос на сите методи кои биле користени порано. Изборот на олигонуклеотидните прајмери претставува една од специфичностите на овој тест. Прајмерите направени по секвенцата на конвенционалниот 16S rDNA ген кој се користи за детекција на сите групи на фитоплазми, означени се како универзални прајмери за сите фитоплазми. Осетливоста на детекцијата на фитоплазмите се зголемува со користењето на вториот, вгнездениот PCR (*Nested PCR*), (Jones, 2002).

Голем број автори во своите трудови ги имаат објавено секвенците за универзалните и специфичните прајмери за детекција на фитоплазмите. Универзалните прајмери се базирани на секвенците од конвенционалниот дел од геномот на фитоплазмите и тоа на 16S rDNA генот.

Најчесто користени универзални прајмери за амплификација на 16S rDNA генот на фитоплазмите е прикажан во Табела 1.

Табела 1. Прајмери за PCR амплификација на 16S rDNA генот на фитоплазмите (Jones, 2002)

Прајмер	Секвенца (5'- 3')	Референца
P1	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT	Deng & Hiruki (1991)
520F	GTGCCAGCAGCCGCGG	Namba et al. (1993)
P4	GAAGTCTGCAACTCGACTTC	Smart et al. (1996)
920R	GTCAATTCCTTTAAGTTT	Namba et al. (1993)
P6	CGGTAGGGATACCTTGTTACGACTTA	Deng & Hiruki (1991)
P7 (23S)	CGTCCTTCATCGGCTCTT	Smart et al. (1996)
R16mF2	CATGCAAGTCGAACGGA	Gundersen & Lee (1996)
R16mR1	CTTAACCCCAATCATCGAC	Gundersen & Lee (1996)
R16F2n	GAAACGACTGCTAAGACTGG	Gundersen & Lee (1996)
R16R2	TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG	Gundersen & Lee (1996)

Специфичните прајмери се користат за детекција на одредени специфични групи на фитоплазми. Тие се комплементарни за делот од ДНК секвенците кои ги поседуваат само тие специфични групи на фитоплазми и понекогаш можат да дадат многу повеќе податоци за предизвикувачите на болеста за разлика од универзалната група на прајмери.

За амплификација на FD9 нерибозомалниот ДНК фрагмент од Elm yellows фитоплазмите (жолтилата на брестот), Angelini и сораб. (2001) користат специфични групи на прајмери дадени во Табела 2.

Табела 2. Специфични прајмери за амплификација на FD9 ДНК фрагментот од групата Elm yellows фитоплазми (жолтила на брестот) (Angelini et al. 2001)

Прајмер	Секвенца (5'- 3')	Референца
FD9f	GAATTAGAACTGTTTGAAGACG	Daire et al. (1997)
FD9f2	GCTAAAGGTGATTTAAC	Angelini et al. (2001)
FD9f3	GGTAGTTTTATATGACAAG	Angelini et al. (2001)
FD9r	TTTGCTTTCATATCTTGTATCG	Daire et al. (1997)
FD9r2	GACTAGTCCCGCCAAAAG	Angelini et al. (2001)

Понекогаш, поради ниската концентрација на фитоплазмите кај заразените растенија, присуството на инхибирачките материјали во екстрактите, ниската концентрација на фитоплазматската ДНК во екстрактите, по PCR-от се добива мала количина на амплифицирана ДНК. Во тој случај амплифицираните продукти се слабо видливи или воопшто не се видливи.

Количината на PCR умножените ДНК продукти може да се зголеми со втор, вгнезден PCR (*nested PCR*) (Jones, 2002).

4.1.5. RFLP анализа на PCR добиените фрагменти од ДНК

Рестрикциското мапирање претставува обработка на ДНК со една или повеќе различни групи на рестрикциски ензими и раздвојување на рестрикциските фрагменти по големина, со помош на електрофореза во агарозен гел (ако се поголеми од 200 bp) или со помош на полиакриламиден гел (ако се помали од 200 bp). Оваа метода е позната како полиморфизам на должината на рестрикциските фрагменти (Restriction fragment length polymorphism – RFLP) и била воведена уште во седумдесеттите години и е заслужна за повеќе важни откритија, генерално во полето на молекуларната биологија.

Од почетокот на седумдесеттите години до денес биле пронајдени неколку стотини различни рестрикциски ензими – ендонуклеази. Своего име го добиле по видот на бактеријата од која се изолирани. Се земаат првите букви од бактерискиот ентитет од кој се изолирани, а со римските букви се означува редоследот на детектираниот ензим кај истата бактерија.

Според литературните написи, рестрикциските ендонуклеази се претставени илустративно како ДНК скалпели, поради нивната карактеристична функција за пресекување на фосфодиестерските врски, на точно определени и за нив препознатливи рестрикциски позиции (Griffiths, 2005).

Рестрикциските ензими специфично се врзуваат за одредена секвенца (т.н. место на препознавање), на двоверижната ДНК и зависно од типот, вршат хидролиза на местото на препознавање или на одредено растојание (Mitrovič, 1997).

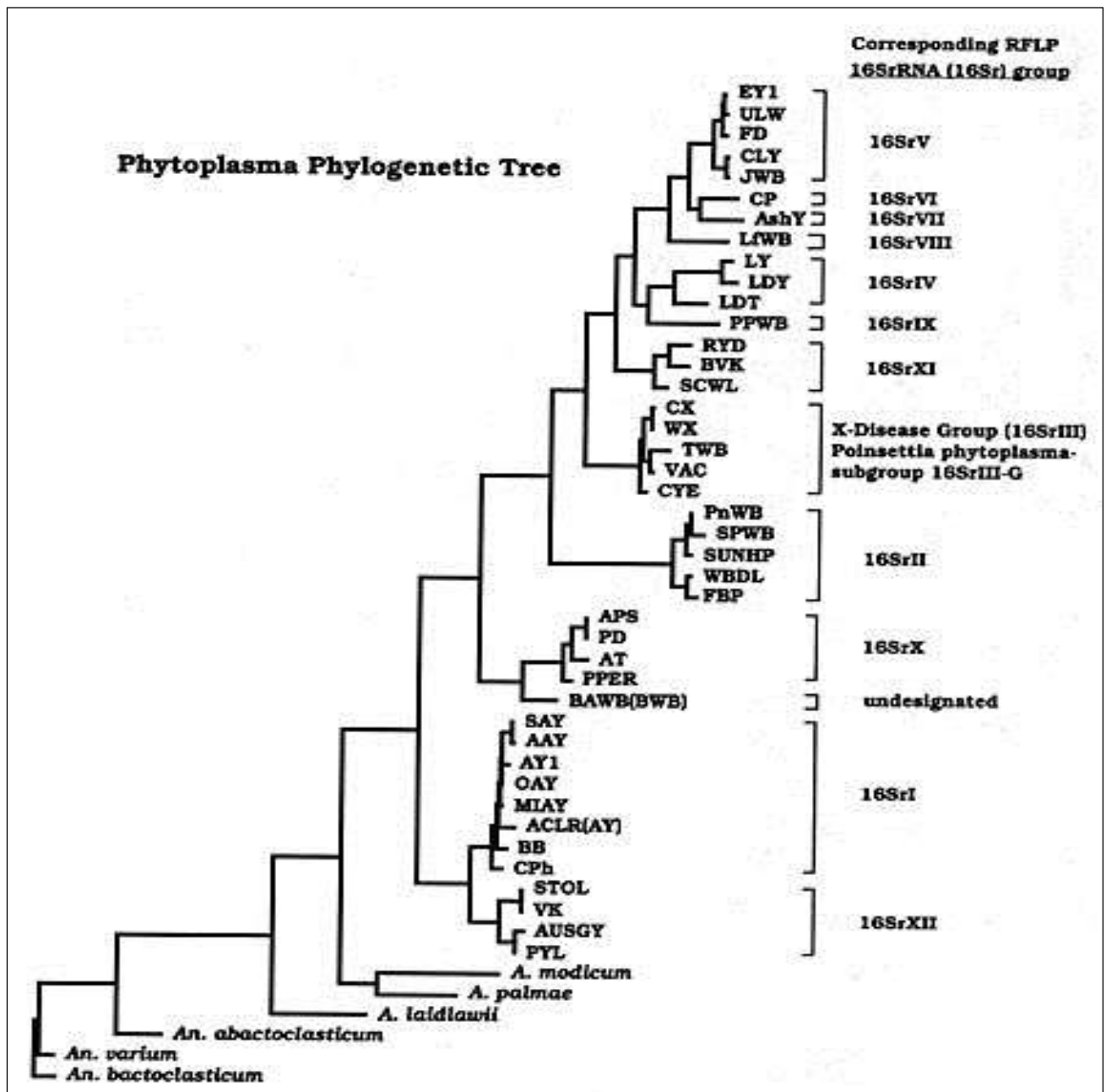
16SrDNA генот станал лесно достапен преку PCR методата, а RFLP анализата на PCR умножените фрагменти станала рутинска метода за детекција и диференцијација на фитоплазмите.

Диференцирањето, исто така, било подобро и олеснето со воведување на поголем број на рестрикциски ензими (Seemüller et al., 1998).

Дигестијата со рестрикциските ензими на амплифицираните фрагменти овозможила прецизна детекција и класификација на фитоплазмите (Jones, 2002).

PCR-RFLP анализата на rDNA фитоплазмите е посебно добра за детекција и карактеризација на фитоплазмите во случај на голем број на примероци, во локалитетите каде не се познати никакви податоци за причинителите на болестите или кога постојат поголем број на различни фитоплазми во испитуваниот локалитет (Boudon-Padieu E., 2000).

Фитоплазматското филогенетско дрво направено врз основа на RFLP анализата на 16S генот е прикажано на Слика 6.



Слика 6. Карактеризација на фитоплазмите со RFLP метода
(слика преземена од <http://www.apsnet.org/Education/feature/poinsettia/images/figure8.htm>)

4.1.6. Проблеми во детекцијата на фитоплазмите

Според Boudon-Padieu и сораб. 1998, нерамномерната дистрибуција, малата концентрација и сезонската варијабилност на фитоплазмите во заразените растенија, претставуваат најголем проблем за воведување и стандардизација на методата за брза и рутинска детекција на фитоплазмите (цитирано според Petrivič et al., 2000).

Веќе споменавме дека фитоплазмите неможат да се одгледуваат *in vitro*, па така најголем број на методи кои денес се користат за детекција на фитоплазмите од заразените растенија и инсектите-вектори, се базираат на молекуларните техники.

За нивното користење постојат две причини: првата е таа што молекуларните методи даваат поголема осетливост од серолошките методи, но и од сите други досега користени, а другата причина е тоа што за создавање на специфични антители потребна е голема количина прочистени или делумно прочистени фитоплазми, што е во однос на титарот на фитоплазмите во растенијата, релативно тешко (Boudon-Padieu, 2000).

Но, молекуларните методи сè уште се развиваат, а во праксата имало случаи кога со универзалната група на прајмери не е можно да се докаже присуството на фитоплазмите (Jones, 2002). Освен тоа, поради големината на геномот (0,5-1,3 Mbp) потребно е да се направат повеќе полимеразно верижни анализи, за да се удвои геномот на фитоплазмите и да може да се види на електрофореграмот.

Поради осетливоста на методата, и поради градбата и големината на геномот на фитоплазмите, секогаш треба да се внимава на инхибиторите (протеини, липиди и други клеточни компоненти) кои често можат да дадат лажни електрофореграми или да предизвикаат отсуство на електрофореграми за кои очекуваме позитивни резултати.

4.2. Материјал за работа

Двогодишните истражувања при изработка на овој магистерски труд опфаќаат:

1) Теренски истражувања:

- ❖ препознавање на симптомите од фитоплазмозите кај виновата лоза;
- ❖ испитување на текот на болеста, појавата на симптомите и можноста за излекување на заболените гранчиња од винова лоза;
- ❖ утврдување на присуството на фитоплазмите кај виновата лоза во различни региони и кај различни сорти во Република Македонија;
- ❖ докажување на штетноста на фитоплазмозите кај виновата лоза;
- ❖ проучување на етиологијата на болеста и идентификација на патогенот.

2) Лабораториски истражувања:

- ❖ Молекуларни методи за докажување на присуството на фитоплазмите:
 - а) *екстракција на дезоксирибонуклеинската киселина (DNA)* од фитоплазмите;
 - б) *полимеразна верижна реакција (Polymerase Chain Reaction – PCR)* – директен и вгнезден (*nested PCR*);
 - в) *полиморфизам на должината на рестрикциските фрагменти (restriction fragment length polymorphism - RFLP)* за типизација на видот на фитоплазмата.

4.2.1. Собирање на примероци од растенија со симптоми на жолтило во лозовите насади во Република Македонија

За определување на присуството на фитоплазматските заболувања во поголемите региони под винова лоза на територијата на Република Македонија, беше вршено собирање на листови од заболените сорти на винова лоза, во двогодишниот период од летото 2006 до есента 2007 година.

За лабораториска анализа беа колекционирани примероци од различни сорти на винова лоза (fam. *Vitaceae*, *Vitis vinifera* L.), претежно од винските сорти (бидејќи забележавме дека кај трпезните сорти има многу мал процент или воопшто нема инфекција од фитоплазмите). Беа одбрани седум големи локалитети, со тринаесет прегледани виногорја, се со цел потврдување на присуството/отсуството на фитоплазмите (Табела 4).

Собраните примероци покажуваа симптоми карактеристични за жолтилата кај виновата лоза, како што се: пожолтувања на листовите со свиткување на лисните краеве кон внатре и добивање на карактеристичен триаголен изглед, неправилно здрвенување на ластарите, сушење на плодовите и изумирање на целата лозанка.

Во лозовите насади каде визуелно не можеа да се согледаат карактеристични симптоми се колекционирани асимптоматични примероци, кои беа посебно маркирани на терен и забележувани во табелата за евиденција во лабораториски услови (Табела 3).

Освен примероци од виновата лоза, на некои локалитети се собирани и примероци од околната вегетација, вклучувајќи и голем број на плевелни растенија за кои претходно имаше информации дека можат да бидат домаќини на фитоплазмите.

Табела 3. Шифрарник - користен во базата на податоци за виновата лоза

Генерални податоци за лозовите региони – теренски податоци
<p>Локалитет</p> <p>Регион</p> <p>Култура (сорта на винова лоза)</p> <p>Старост на лозанката (година на поставување на насадот)</p> <p>Потекло на садниот материјал</p> <p>Симптоми (визуелни симптоми од теренската анализа)</p> <p>Датум на колекционирање на материјалот</p>
Лабораториска анализа на материјалот
<p>Датум на екстракција на ДНК</p> <p>PCR анализа – P1P7 – M1B6</p> <p>PCR анализа – P1P7 – I F1R1</p> <p>анализа на <i>tuf</i> генот</p> <p>RFLP анализа</p>

4.2.2. Пуфери и раствори кои беа користени при лабораториските анализи

4.2.2.1. Пуфери и раствори за изолација и чување на ДНК од растителниот материјал

а) 3% СТАВ пуфер за екстракција („extraction buffer”). За 1000 ml пуфер се користи:

СТАВ	30 g (финална концентрација 3%)
Tris	121,1 g (финална концентрација 1 M)
NaCl	81,82 g (финална концентрација 1,4 M)
EDTA 0,5 M	40 ml (финална концентрација 20 mM)
редестилирана вода до 1000 ml	

pH 8.0 (подесување со концентрирана HCl)

Подготвениот раствор е чуван на темно. Пред употреба е приготвен пуфер за толку примероци колку што се предвидени за анализа (7 ml по примерок). На подготвениот работен раствор за таа екстракција се додава 3% PVP (Polyvinyl pirrolidone).

б) EDTA 0,5 M, pH 8.0. За 100 ml пуфер беа растворени 18,61 g Na_2EDTA во 50 ml вода. Беше подесена pH на 8.0, додаден е NaOH ие дополнето до 100 ml со вода.

в) изопропанол (2-пропанол)

Се чуваше во фрижидер на температура од -20°C до употребата.

г) етанол 70%.

Се чуваше во фрижидер на температура од -20°C до употребата.

д) TE пуфер, pH 8,0. За подготвување на растворот за чување на екстрахираната DNA, беше користен 10 mM Tris и 1 mM EDTA. Растворот се чуваше во фрижидер на температура од -20°C до употребата.

4.2.2.2. Пуфери и раствори за електрофореза во агарозен гел

а) TBE – пуфер, pH 8,3:	Tris	90mM
	Борна киселина	90mM
	EDTA	1 mM

На овој начин се подготвуваше 5x концентриран пуфер. Работната концентрација за агарозниот гел и електрофорезата беше 1xTBE.

б) Агароза

Гел агарозата (1%) беше подготвена со растворање на 1,5 g агароза во 150 ml 1xTBE пуфер.

в) Обоен пуфер за електрофореза („loading buffer”):

бром-фенол-сино (BFB)	0,25%
глицерол	30%

г) Етидиум бромид

Концентрираниот раствор од етидиум бромид (10mg/ml) беше подготвен со растворање на 10 mg EtBr во 1 ml редестилирана вода. За боење беше користено 30 µl од концентрираниот раствор во 300 ml вода т.е. EtBr беше со работна концентрација од 1 µg/ml.

4.2.2.3. Пуфери и раствори за електрофореза во полиакриламиден гел

а) TBE – пуфер, pH 8,3

Се подготвуваше на ист начин како и за електрофореза во агарозен гел и при приготвувањето беше користен матичниот раствор од TBE (5x).

б) Полиакриламид

Акриламид/бисакриламид, 40%, раствор во сооднос 29:1. Се чуваше во темно шише на температура од 4°C.

в) TEMED N,N,N',N'- тетраметилетилендиамин

Се чуваше во фрижидер на температура од 4°C.

г) Амониум персулфат (APS) 10%. Се раствора 0,1 g APS во 1 ml редестилирана вода, а растворот секогаш беше подготвен свеж, еднаш неделно. Се чуваше во фрижидер на температура од 4°C.

д) Обоен пуфер за електрофореза (“loading buffer”):

бром-фенол-сино (BFB)	0,25%
глицерол	30%

ѓ) Етидиум бромид. Концентрираниот раствор од етидиум бромид (10mg/ml) е подготвен на ист начин како и кај агарозната гел електрофореза.

4.2.2.4. Ензими, стандарди за одредување на молекулската маса и хемикалии

4.2.2.4.1. Ензими

*Taq*I, *Tru*9I (=MseI), *Hpa*II, кои одат заедно со соодветни реакциски пуфери, (Invitrogen); *Taq* DNA polimeraza, Recombinant и соодветен реакциски пуфер, (Invitrogen); смеса на дезоксинуклеозид-трифосфати (dNTPs), 100 mM dNTP Set, PCR Grade Invitrogen.

4.2.2.5. Стандарди за одредување на молекулската маса

1 Kb DNA Ladder, Invitrogen. Смеса на фрагменти за одредување на големината на двојно спиралниот DNA молекул од 500 bp до 12 kb. Содржи 13 фрагменти со следнава должина (во bp): 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 700, 500, 300.

Plasmid pBR322, Invitrogen. Смеса на фрагменти добиена со прочистување на *E. coli*, DH10B. Содржи 15 фрагменти со следнава должина (во bp): 587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124, 123, 104, 89, 80.

4.2.2.6. Хемикалии

Агароза, Invitrogen, SAD

Акриламид, Invitrogen, SAD

Амониум-персулфат APS, Invitrogen

Бис-акриламид, Sigma Chemical Co., SAD

Борна киселина, Carlo Erba, Italija

СТАВ, Sigma Chemical Co., SAD

EDTA, Sigma Chemical Co., SAD

Етанол, Alkaloid, Skopje

Етидиум бромид, Sigma Chemical Co., SAD

Изопропанол, Alkaloid, Skopje

Хлороформ, Carlo Erba, Italija

PVP-10, Sigma Chemical Co., SAD

TEMED, Fluka BioChemika, Швајцарија

Tris, Invitrogen, SAD

4.3. Метод на работа

4.3.1. Изолација на дезоксирибонуклеинската киселина (ДНК) од растителното ткиво

За молекуларна детекција на фитоплазмите од колекционираниот материјал прво беше извршена екстракција на дезоксирибонуклеинската киселина (ДНК). Од колекционираните симптоматични примероци, измерено е 1g ткиво (од главната нерватура) и е замрзнато (-20°C). Екстракцијата беше извршена по веќе опишан СТАВ протокол на работа (Angelini et al., 2001).

Претходно исеченото и смрзнато ткиво (1g лисна нерватура) се хомогенира со течен азот во стерилни порцелански аванчиња и толчници до прав, и веднаш директно се додава пуфер за екстракција (7ml 3% СТАВ + 2-меркаптоетанол). Хомогенатот (1ml) се префрла во микроцентрифугални епруветки од 2ml и се инкубира во водена бања на температура од 65°C за време од 20 минути. Потоа се додава 1ml хлороформ, се промешува и центрифугира на 11.000 rpm за време од 10 минути, на собна температура. Внимателно се префрла горната водена фаза во друга епруветка од 2ml и се додава изопропанол. Се центрифугира на 11.000 rpm за време од 15 минути. Се отфрла супернатантот и се промива талогот со 70% етанол. На крај, епруветките се сушат на 37°C за време од 30 минути до 1 час (сè до потполно испарување на етанолот). Исушениот талог (екстрахираната DNA) се раствора со 100 µl ТЕ пуфер (Tris-EDTA pH 7,4) (20ng/µl), потоа епруветките се промешува и се остава 16 до 18 часа да рехидрираат на температура од 4°C.

Примероците се чуваат на температура од -20°C, но пред почетокот на анализите се прави работна концентрација на ДНК за PCR реакцијата.

4.3.2. Умножување на фитоплазматскиот 16Sr DNA ген со полимеразно верижна реакција

За докажување на присуството на фитоплазматскиот 16S rDNA ген со полимеразно верижната реакција се користат следните прајмери (шематски прикажани на Слика 7):

- Универзални парови на бази **R16 P1P7** (Deng & Hiruki, 1991; Smart *et al.*, 1996), за директен PCR:

R16 P1: 5'AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT 3'

R16 P7: 5' CGTCCTTCATCGGCTCTT 3'

Овој сет на прајмери го амплифицираат 16S-23S рибозомалниот генски регион на 1800 bp.

- Универзални парови на бази **R16 M1B6** (Martini *et al.*, 1999), за nested PCR:

M1 (16R758F): 5' GTC TTT ACT GAC GCT GAG GC 3'

B6 (M23Sr): 5' TAG TGC CAA GGC ATC CAC TGT G 3'

Овој сет на прајмери го амплифицираат 16S-23S рибозомалниот генски регион на околу 1050 bp.

- Специфични парови на бази **R16 (I) F1R1** (специфични за групата **16Sr-I** и **16Sr-XII** (Lee *et al.*, 1994) за nested PCR:

R16 (I) F1: 5' TAA AAG ACC TAG CAA TAG G 3'

R16 (I) R1: 5' CAA TCC GAA CTG AGA CTG T 3'

Овој сет на прајмери го амплифицираат 16S-23S рибозомалниот генски регион на околу 1100 bp.

За специфичниот *tuf* ген беа користени следниве групи на прајмери (шематски прикажани на Слика 8):

- Специфични парови на бази **ftuf1-rtuf1** (Langer & Maixner, 2004) за директен PCR:

ftuf1: 5' CAC ATT GAC CAC GGT AAA AC 3'

rtuf1: 5' CCA CCT TCA CGA TAT GAG AAC 3'

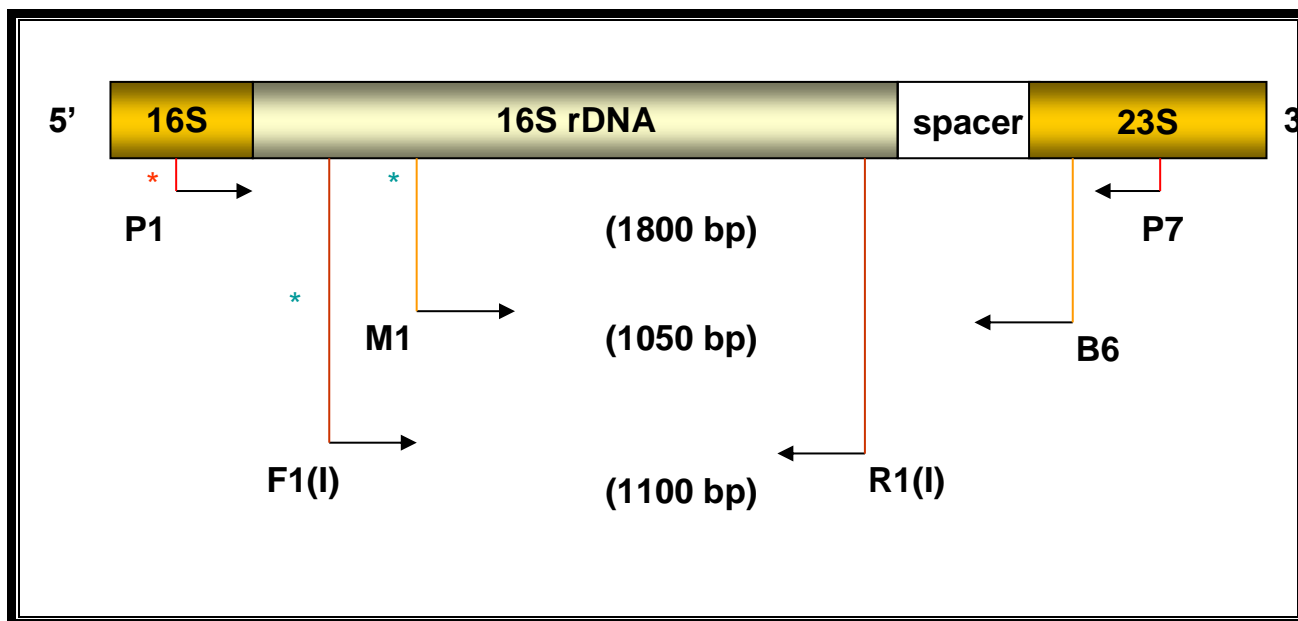
Овој сет на прајмери го амплифицираат регионот на *tuf* генот на околу 1080 bp.

- Специфични парови на бази **ftufAY-rtufAY** (Langer & Maixner, 2004), за Nested PCR:

ftufAY: 5' GCT AA AGT AGA GCT TAT GA 3'

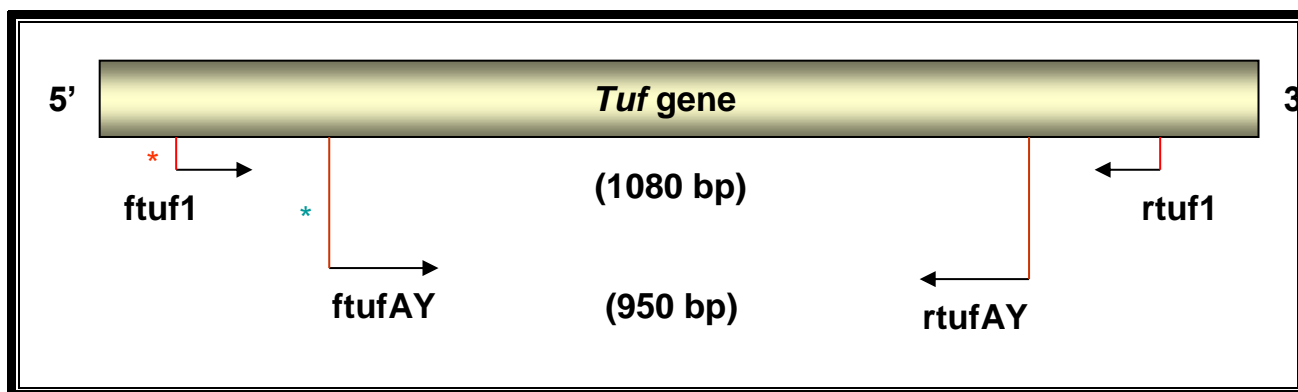
rtufAY: 5' CGT TGT CAC CTG GCA TTA CC 3'

Овој сет на прајмери го амплифицираат регионот на *tuf* генот на околу 950 bp.



Слика 7. Локација на прајмерите за 16S rDNA регионот кои беа користени при идентификација на фитоплазмите кај виновата лоза

* директен PCR
* вгнезден (nested) PCR



Слика 8. Локација на прајмерите за *tuf* генот кои беа користени при идентификација на *Bois noir* фитоплазмите кај виновата лоза

* директен PCR
* вгнезден(nested) PCR

Директен PCR

Директниот PCR се прави со универзална група на прајмери, R16 P1P7, каде реакциската смеса се подготвува во totalен волумен од 20 µl на следниот начин:

- 1 µl од примерокот DNA (20ng/ µl)
 - 2 µl реакциски пуфер за PCR (10xBf without MgCl₂)
 - 1.2 µl MgCl₂
 - 0.6 µl dNTPs (100 mM на секој деоксирибонуклеотид)
 - 0.75 µl преден прајмер P1 (20 µM – *forward primer or sense*)
 - 0.75 µl реверзен прајмер P7 (20 µM – *reverse primer or antisense*)
 - 0.15 Taq polimeraza (5U/µl)
 - 13.55 стерилна дејонизирана вода
-

20 µl totalен волумен

Реакциските циклуси, вкупно 37, се одвиваа во PCR машини или термосајклери - Mastercycler Eppendorf според следниве услови (Angelini *et al.*, 2001):

Чекори	Иницијална денатурација	34 циклуси на реамплификација			Терминална екстензија
		денатурација	анилирање	екстензија	
време/ температура	3 минути - 94°C	1 минута – 94°C	2 минути - 50°C	3 минути – 72°C	5 минути – 72°C

Умножените фрагменти од DNA од 1,8 kbp обично не се видливи при анализа во агарозна електрофореза во 1% агарозен гел, па затоа веднаш по директниот PCR се прави вгнезден (*nested* PCR). При умножување со користење на прајмерскиот пар за специфичниот елонгациски фактор Tu (*tuf* ген), реакциските циклуси беа малку изменети и се одвиваа на следниот начин:

Чекори	Иницијална денатурација	35 циклуси на реамплификација			Терминална екстензија
		денатурација	анилирање	екстензија	
време/ температура	3 минути - 94°C	1 минута – 94°C	2 минути - 45°C	3 минути – 72°C	5 минути – 72°C

Вгнезден (*nested PCR*)

Умножените фрагменти од DNA од директниот PCR се разредуваат со автоклавирана дејонизирана вода 50 пати и се користат како калап за „вгнездена“ верижна полимеразна реакција во која ги користев **R16 M1B6** паровите на бази.

Реакционата смеса се приготвува на следниот начин:

1 µl од разредениот продукт од директниот PCR
 2 µl реакциски пуфер за PCR (10xBf without MgCl₂)
 1.2 µl MgCl₂
 0.6 µl dNTPs (100 mM на секој деоксирибонуклеотид)
 0.75 µl преден прајмер P1 (20 µM – *forward primer or sense*)
 0.75 µl реверзен прајмер P7 (20 µM – *reverse primer or antisense*)
 0.15 Taq polimeraza (5U/µl)
 13.55 стерилна дејонизирана вода

20 µl тотален волумен

Реакционите циклуси беа еднакви како за директниот PCR.

Ваков тип на PCR се прави и со другите специфични групи на прајмери (**R16(I)** **F1R1**, **ftufAY-rtufAY**).

Во секој реакционен циклус, покрај испитуваните примероци беа вклучени и позитивна контрола (стандарден сој од фитоплазма) и негативна контрола (стерилна дејонизирана вода).

Сите амплификации се изведуваа во строго контролирани услови кои обезбедуваат минимален ризик од молекуларна контаминација. Поради фактот дека се работи за фитопатогени бактерии кои се многу осетливи и чија контаминација може да настане многу лесно, анализите се изведуваа под строго организирани критериуми на лабораториска работа:

- екстракцијата на DNA за анализа се вршеше во дигестори каде се користеше посебна опрема за безбедно работење (лабораториска облека, заштитни ракавици и очила);
- PCR амплификацијата се изведуваше во посебни ламинарни комори со што се избегнуваше можноста за молекуларна контаминација на примероците;
- беа користени посебни сетови на пипетори за секој чекор во реакциска смеса посебно;
- дезинфекцијата на воздухот и работните површини се вршеше со ултравиолетови ламби пред и по секоја анализа.

4.3.3. Анализа на умножените фрагменти со електрофореза во 1% агарозен гел

Електрофоретската анализа на сите умножени фрагменти на фитоплазматскиот ген за 16S rDNA (освен продуктите на директниот PCR) се изведуваше на 1% агарозен гел во хоризонтална електрофореза (Bio-Rad). Гелот се подготвуваше во 1 x TBE пуфер (истиот кој се користи како електрофоретски пуфер). Секој примерок на ДНК се мешаше со пуферот за примероци во однос 5 дела ДНК со еден дел 6 x концентриран GLB – пуфер за ДНК примероци. Електрофорезата се одвива за време од 30 минути до 1 час (сè додека линијата на бромфенол сино не достигне до околу 1 cm од долниот аноден дел на гелот), при константен напон од 100 V и јачина на струјата од 22 mA.

Како молекуларен стандард се аплицира маркер - 1kb DNA ladder (Invitrogen), 3 µl маркер + 1 µl обоен пуфер.

По електрофорезата, гелот се бои во етидиум бромид (1 µg/ml) за време од 15 минути. Електрофоретските ленти беа визуелизирани на UV-трансилуминатор при 312 nm и снимени со дигитална камера.

4.3.4. Анализа на полиморфизмот на должината на рестрикциските фрагменти (RFLP) на фитоплазматскиот 16S rDNA ген

Сите умножени фрагменти добиени при полимеразната верижна реакција се пресекуваат поединечно со рестрикциски ендонуклеази, со што се овозможува добивање на ДНК фрагменти со различна молекулска маса.

Рестрикциската смеса се подготвува на следниот начин:

- PCR продукти (3-10 µl зависно од количината на ДНК);
- 2 µl пуфер за дигестија (10x);
- 0,3 µl рестрикциски ензим;
- стерилна дејонизирана вода (до вкупен волумен од 5 µl).

Вкупниот волумен на реакционата смеса изнесува 15 µl.

Инкубацијата се одвиваше 16 часа при температура од 37°C за рестрикциските ензими *TaqI*, *Tru9I* (= *MseI*), *HpaII*.

Анализата на ДНК дигестираните фрагменти се вршеше со вертикална електрофореза, во 13% и 5% полиакриламиден гел кои се подготвуваше на следниот начин:

Полиакриламиден гел 13%		Полиакриламиден гел 5%	
Дејонизирана вода	9,3 ml	Дејонизирана вода	15,4 ml
TBE 5x	8 ml	TBE 10x	2 ml
AA+Bis	6,6 ml	AA+Bis	2,6 ml
TEMED	20 μ l	TEMED	14 μ l
APS	200 μ l	APS	140 μ l

Гелот се излева во вертикален систем на електрофореза, меѓу две стаклени површини со простор меѓу нив од 0,75 mm или 1 mm. Во празнините на гелот, се нанесува 10 μ l тотален волумен на дигестирана ДНК и обоен пуфер за електрофореза. Како молекуларен стандард се користи pBR322, кој се разредува 5 пати и се нанесува 7 μ l тотален волумен. Електрофорезата се одвива во 1 x TBE – пуфер во апарат за вертикална електрофореза, Hoefer SE 600/SE 600, во времетраење од 2 часа и 15 минути на 150V/20mA.

Геловите се бојат во етидиум бромид (1 μ g/ml), а потоа се осветлуваат на UV - светлина на трансилуминатор и се фотографира со дигитална камера.

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1. Симптоми од фитоплазматско жолтило кај виновата лоза

Кон крајот на летото и раната есен во 2006 година е започнато со преглед и колекционирање на материјал за анализа од виновата лоза, од поголемите лозови региони на територијата на Република Македонија (Табела 4). Во овој период од годината симптомите на жолтила кај виновата лоза се најјасно видливи и се добива најдобра слика за раширеноста на заразата во лозовите насади.

Во 2006 година, прегледите беа извршени на трпезни и на вински сорти винова лоза, но посебен акцент беше ставен на винските сорти, кои беа во многу поголеми површини застапени за разлика од трпезните сорти. Во сите испитувани површини, беше маркиран редот од кој се колекционираше материјалот и симптоматичната лоза во редот.

При колекционирањето на материјалот, на почетокот на следењето на симптоматологијата, се земаше материјал од секоја лоза поединечно, а во текот на истата сезона се правеше збир од лози со исти симптоми (најчесто се правеше збир од 3-5 лози).

Прегледите беа извршени во периодот од 2006 до 2008 година, при што во сезоната 2007 следењето на состојбата на површините под винова лоза беше започнато од почетокот на вегетацијата, затоа што зимскиот период беше доста сушен и со високи температури поволни за презимување на фитоплазмите и рано појавување на симптомите.

Покрај раниот почеток на прегледите, најголем акцент на маркирање и колекционирање на примероците беше во периодот од август до крајот на вегетацијата, поточно до фазата на зимско мирување (крај на октомври, почеток на ноември).

Во периодот на сезоната 2007, беше извршен детален преглед на сите оние лозови региони маркирани во 2006 година, со цел да се утврди степенот на раширеност на фитоплазмите.

За да се одреди присуството и распространетоста на фитоплазмите, беа прегледувани 16 сорти на винова лоза од 7 региони (13 локалитети), за време на двегодишното истражување.

Беше следена и околната плевелна вегетација, како можен резервоар и извор на зараза.

Табела 4. Локалитети од кои беше колекциониран материјалот за анализа и симптоми од теренските прегледи

Регион	Локалитет	Година на подигнување на лозовиот насад	Сорта	Присуство на типични симптоми	
				2006	2007
Неготино	Ило Виларов	1999	италијански ризлинг	+	+
		1990	смедеревка	+	++
		1999	вранец	+++	+++
		1990	белан	+	+
		1995	'ркцатели	-	*
		1986	жилавка	+	*
		1999	траминец бел	*	+
		1999	мускат отонел	*	++
	Дуброво	1981	'ркцатели	+	+
		1974	траминец бел	+	+
		2004	кратошија	+	+
		1982	смедеревка	+	*
Кавадарци	П.Е. Љубаш	1997	мускат италија	-	-
		1997	афус али	-/+?	-
		2001	смедеревка	-?	++
		1999	шардоне	+	++
Струмица	Хамзали	1990	белан	+	*
		1990	вранец	+	++
		1990	'ркцатели	-/+?	*
		1985	смедеревка	+	*
		2004	викторија	*	+
Радовиш	Добридол	1990	пловдина	-	*
		1985	смедеревка	+	*
		1990	рајнски ризлинг	-	-
		1990	вранец	++	++
Штип	Каваклија	1995	рајнски ризлинг	?	*
		1990	бургундец црн	-/+?	-
		1997	афус али	-	*
	Ежово	1986	афус али	-	-
		1990	вранец	++	++
	Три Чешми	1986	смедеревка	+	++
		1986	рајнски ризлинг	-	*
		1986	бургундец црн	++	++
	Врсаково	1977	вранец	++	++

Табела 4.

Регион	Локалитет	Година на подигнување на лозовиот насад	Сорта	Присуство на типични симптоми	
				2006	2007
Куманово	Табановце	2000	<i>вранец</i>	*	+?
		2000	<i>бургундец црн</i>	*	+?
	Петрличани	1999	<i>шардоне</i>	*	+
Велес	Сопот	1993	<i>шардоне</i>	+++	+++
		1993	<i>каберне совиньон</i>	+?	-
	Витанци	1999	<i>бургундец црн</i>	-/+?	*
		1998	<i>каберне совиньон</i>	-	*
		1996	<i>вранец</i>	+?	*

-/+? сомнителни симптоми
 + слабо изразени позитивни симптоми
 ++ зафатен поголем дел од лозанката
 +++ потполна инфекција на целата лоза
 - негативни симптоми
 * не е прегледано

Изведените прегледи потврдија дека кај заболените ластари од виновата лоза се јавуваат низа патогени промени. Типот и интензитетот на овие промени зависи од фенофазата, сортата и нејзината осетливост кон фитоплазматските заболувања, како и од староста на лозанката.

Нашето двегодишно истражување за состојбата од фитоплазматското заболување не наведе кон правец на детално проучување на промените кои настануваат кај една лозанка. Промените можат да бидат парцијални и да ги зафатат само дел од листовите, но многу често забележувавме промени на ластарите, но и на цветовите и гроздовите. Таквите промени кај лозанката делуваат на виталноста како и на должината, векот на живот на заболената лоза.

Генерално, од нашето истражување, забележавме дека кај заболените лози сите промени кои настануваат одат во надолна линија во однос на производството, тргнувајќи од формирањето на цветовите (намален процент на формирање цветови) а со тоа намалување на квалитетот и приносот на грозје.

Нашите теренски истражувања беа насочени кон промените кои се најзначајни за откривање и препознавање на фитоплазмозите кај виновата лоза.

Првата група на симптоми, која не наведуваше да извршиме подетален преглед на целата лоза, беа промените на бојата и формата на листовите.

Следната група на симптоми беше преглед на ластарите, нивно нерамномерно задрвенување, нелигнифицирање и полегнување на ластарот на земја.

На крај, се вршеше преглед на плодовите (гроздовите), кои во случај на позитивни промени кај горенаведените делови од лозата, тие стануваат како гума, се сушат и добиваат горчлив и кисел вкус.

Доколку овие симптоми се појават сите заедно, тогаш може да се каже дека се работи за фитоплазматска промена кај лозата, но доколку се појават само промена на бојата на листовите или само гумазност на гроздовите со кисел вкус, тогаш таквите промени се неспецифични за фитоплазмозите и можат да се појават како резултат на биотски и абиотски фактори.

Промена на листовите

Кај белите сорти на винова лоза, препознатливи симптоми на листовите се жолтеене, свиткување на лисните краеве надолу во форма на триаголник и некрозирање. Листовите на почеток добиваат светло-жолта боја, за да добијат сјајна златно-жолта боја до крајната фаза на болеста, која се прелива под влијание на сончевите зраци (Слики 9 и Слика 10).



Слика 9. Симптоми на фитоплазматско жолтеене кај сортата *белан* од лозовиот регион Хамзали во Струмица

Кај ластарите, кај кои беа маркирани симптоматичните листови, забележавме кон средината на вегетацијата предвремено опаѓање на листовите, но без лисната дршка (petioles).



Слика 10. Симптоми на фитоплазматско жолтеење кај сортата *шардоне* од лозовиот регион Сопот во Велес

Во доцниот стадиум на болеста доаѓа до некроза по лисната нерватура и краевите, и настанува лесна кршливост на листовите (Слика 11).



Слика 11. Симптоми кај сортата *шардоне* од лозовиот регион Ило Виларов, Неготино – доцен стадиум на болеста

Кај црните сорти на винова лоза доаѓа до потемно или посветло поцрвенување на листовите (Слика 12), кои како и кај белите сорти, во доцниот стадиум на болеста почнуваат да некрозираат (Слика 13).



Слика 12. Симптоми на фитоплазматско "поцрвенување" кај сортата *бургундец црн* (материјал колекциониран од лозовиот регион Три Чешми, Штип)



Слика 13. Некрозирање на заболените листови - сорта *бургундец црн*

Промена на ластарите

Најзначајна промена која беше потврдена кај заразените ластари од виновата лоза е нивното недоволно задрвенување т.е. нивната еластичност (Слика 14 и Слика 15). Таквите ластари се извиени и полегнуваат кон земјата. Поради недоволното одрвенување, таквите заболени ластари се крути и при свиткување лесно пукаат.



Слика 14. Недоволно задрвенување кај сортата *вранец*



Слика 15. Заболени ластари кај сортата *шардоне*

Сушење на гроздовите и изумирање на целата лозанка

Симптомите од фитоплазматските заболувања, во подоцната фаза од инфекцијата јасно се видливи и кај плодовите т.е. гроздовите кај виновата лоза. Во почетокот на инфекцијата, кога се оформени гроздовите, зрната се многу осетливи и кај нив не настанува созревање, туку тие почнуваат да се собираат (спуруваат), стануваат како гума, се сушат и добиваат горчлив и кисел вкус (Слика 16). На крај, доаѓа до нивно целосно исушување (Слика 17).



Слика 16. Спурување на зрната и сушење на гроздинките кај сортата *шардоне* (материјал колекциониран од лозовиот регион Сопот во Велес)



Слика 17. Целосно исушување на заболената лозанка (*бургундец црн*) (материјал колекциониран од лозовиот регион Три Чешми, Штип)

Варирање на фитоплазматските симптоми кај виновата лоза

Интензитетот на гореописаните симптоми, следен во текот на двегодишното истражување на присуството на фитоплазмите, варираше во значителни граници. Овие варирања, пред сè, зависеа од осетливоста на сортата. Според тоа, кај една иста сорта може да се забележи најразлична дисколорација на листовите, најразлично изостанување на задрвенувањето на ластарите, како и некроза, односно изумирање на заболените чокоти.

Анализите на терен покажаа дека најосетливи сорти од виновата лоза се: *вранец* и *шардоне*.

Во најголем број случаи *вранецот* покажуваше најинтензивни симптоми на поцрвенување во фазата на зрелост, т.е. при крајот на периодот на вегетација (крајот на септември, почетокот на октомври) (Слика 18).



Слика 18. Интензивно црвенило на целата лозанка кај сортата *вранец* (материјал колекциониран од лозовиот регион Хамзали, Струмица)

Меѓутоа, голем број на симптоматични чокоти, во различни периоди на вегетација и во различни стадиуми на инфекцијата покажуваа листови со различна дисколорација, како и ластари со различно задрвенување (Слика 19).



Слика 19. Почетен стадиум на развој на болеста – зафатени само мал број на листови (типична системична промена на бојата)

При колекционирањето на материјалот, посебно внимание им се посветуваше на симптоматичните ластари, каде од целото растение само еден ластар или само врвните листови од ластарот се симптоматични. Во таков случај се прегледуваше целиот ластар, затоа што доколку е напукнат при агротехничките мерки од човекот или оштетен од страна на инсект (*Stictocephala bisonia*) може да покаже слични симптоми како и заболувањата од фитоплазмите (Слика 20 и Слика 21).



Слика 20. Симптоми на фитоплазматско жолтило кај сортата *смедеревка*, предизвикани од повреда - при агротехнички мерки од човекот



а)



б)

Слика 21. Типични симптоми карактеристични за фитоплазмозите, предизвикани од инсект

- а) повреда од инсект во вид на прстен (мазен светлокафеав прстен)
- б) постара повреда од инсект во вид на прстен (распукната и задебелена)

Освен примероци од винова лоза, во текот на прегледувањето на лозовите насади беше следена и околната плевелна вегетација, со цел да се направи една релација на движење и опстанување на фитоплазмите.

5.2. Умножување на фитоплазматскиот 16S rDNA ген со полимеразна верижна реакција

За докажување на присуството на фитоплазмите кај виновата лоза не е доволно само проучување на симптоматологијата, туку потребни се понатамошни лабораториски анализи. Нивното докажување го направивме со помош на полимеразна верижна реакција (PCR).

За директниот PCR беше употребена универзалната група на прајмери P1/P7, и добиените продукти беа со големина од 1,8 kbp. Продуктите со оваа големина не беа видливи на агарозна гел-електрофореза и затоа, веднаш по првиот – директниот PCR се прави втор или вгнезден PCR, кој се покажа како многу осетлива метода на детекција на фитоплазмите, иако се присутни во многу мала концентрација во испитуваното ткиво.

Во вгнездениот PCR се користат следните групи на прајмери: M1B6, IF1R1 или VF1R1, кои се употребуваат за универзална детекција на фитоплазмите - за потврдување на позитивна или негативна ДНК. Позитивните примероци кои се добиени со користење на универзалната група на прајмери за сите типови на фитоплазми даваат електрофоретски линии на агарозниот гел со должина од 1,2 kbp.

Групите на прајмери специфични за *tuf* генот, Ftuf1-Rtuf1 (директен PCR) и Ftuf-Rtuf AY (вгнезден, nested PCR), се користеа откако го потврдивме присуството на позитивна фитоплазматска ДНК.

Резултатите кои се добиени од PCR анализата на примероците што се собрани за двегодишното испитување, се прикажани во Табела 5 и Табела 6.

Во текот на истражувањето, континуирано беше собираан материјал од почеток на вегетацијата до крајната фаза на вегетацијата, и сите колекционирани примероци беа подложени на лабораториско тестирање.

Во долунаведените табели се презентирани резултатите од осетливоста на сортата, т.е. присуството на фитоплазмите кај секоја испитувана сорта потврдени со различни групи на прајмери, прикажани на Сликите од 20 до 22.

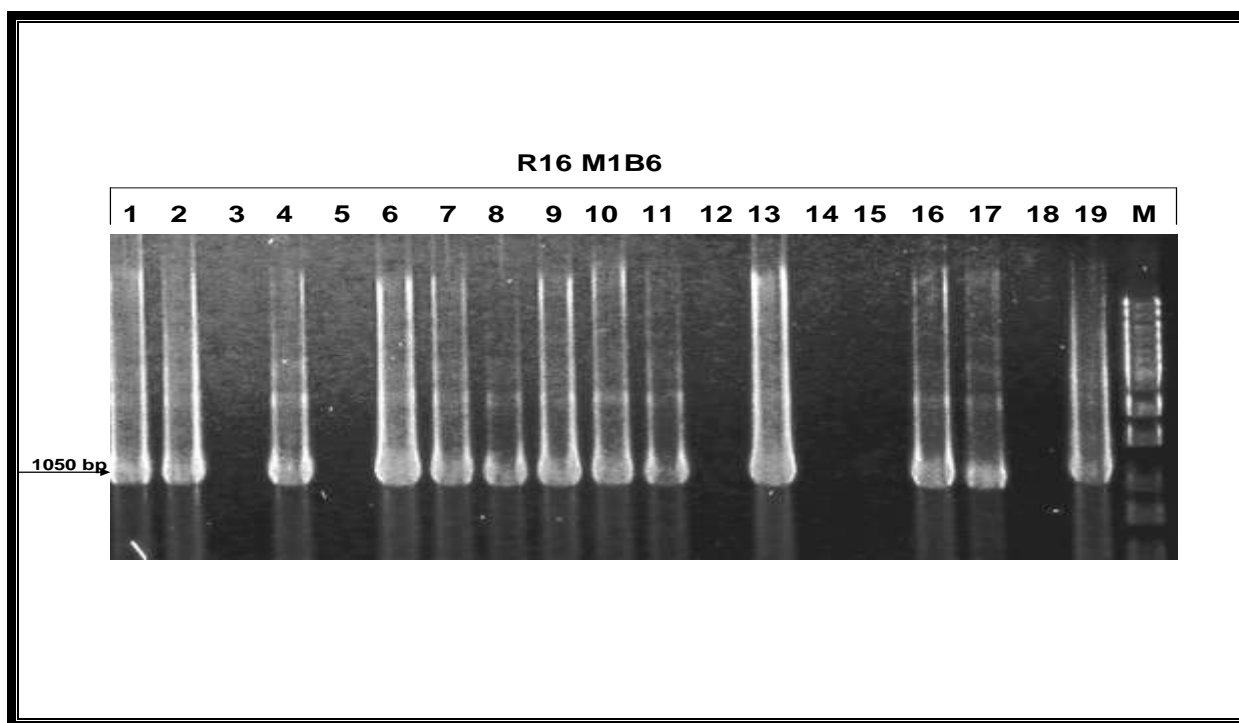
Табела 5. Резултати добиени со користење на различни групи на прајмери за докажување на присуството на фитоплазмите во текот на испитуваната сезона 2006

Регион	Локалитет	Сорта	Присуство на фитоплазматскиот ген докажан со следните групи на прајмери		
			M1/B6	IF1/R1	Ftuf/Rtuf AY
Неготино	Ило Виларов	италијански ризлинг	-	-	-
		смедеревка	+	+	+
		вранец	+	+	+
		белан	+	+	+
		'ркцатели	-	-	-
		жилавка	+	+	+
	Дуброво	'ркцатели	-	-	-
		траминец бел	-	-	-
		кратошија	-	-	-
		смедеревка	-	-	-
Кавадарци	П.Е. Љубаш	мускат италиа	-	-	-
		афус али	-	-	-
		смедеревка	-	-	-
		шардоне	+	+	+
Струмица	Хамзали	белан	+	+	+
		вранец	+	+	+
		'ркцатели	-	-	-
		смедеревка	-	-	-
Радовиш	Добридол	пловдина	-	-	-
		смедеревка	+	+	+
		рајнски ризлинг	-	-	-
		вранец	+	+	+
Штип	Каваклија	рајнски ризлинг	-	-	-
		бургундец црн	-	-	-
	Ежово	афус али	-	-	-
		вранец	+	+	+
	Три Чешми	смедеревка	+	+	+
		рајнски ризлинг	-	-	-
		бургундец црн	+	+	+
	Врсаково	вранец	+	+	+
Велес	Сопот	шардоне	+	+	+
		каберне совинјон	-	-	-
	Витанци	Бургундец црн	-	-	-
		каберне совинјон	-	-	-
		вранец	-	-	-

Табела 6. Резултати добиени со користење на различни групи на прајмери за докажување на присуството на фитоплазмите во текот на испитуваната сезона 2007

Регион	Локалитет	Сорта	Присуство на фитоплазматскиот ген докажан со следните групи на прајмери		
			M1/B6	IF1/R1	Ftuf/Rtuf AY
Неготино	Ило Виларов	италијански ризлинг	-	-	-
		смедеревка	+	+	+
		вранец	+	+	+
		белан	+	+	+
		траминец бел	-	-	-
		мускат отонел	-	-	-
	Дуброво	'ркцатели	-	-	-
		траминец бел	-	-	-
		кратошија	-	-	-
Кавадарци	П.Е. Љубаш	мскат италиа	-	-	-
		афус али	-	-	-
		смедеревка	+	+	+
		шардоне	+	+	+
Струмица	Хамзали	вранец	+	+	+
		викторија	-	-	-
Радовиш	Добридол	смедеревка	-	-	-
		вранец	+	+	+
Штип	Каваклија	бургундец црн	-	-	-
		афус али	-	-	-
	Ежово	афус али	-	-	-
		вранец	+	+	+
	Три чешми	смедеревка	+	+	+
		бургундец црн	+	+	+
	Врсаково	вранец	+	+	+
Куманово	Табановце	вранец	-	-	-
		бургундец црн	-	-	-
	Петрличани	шардоне	-	-	-
Велес	Сопот	шардоне	+	+	+
		каберне совинјон	-	-	-

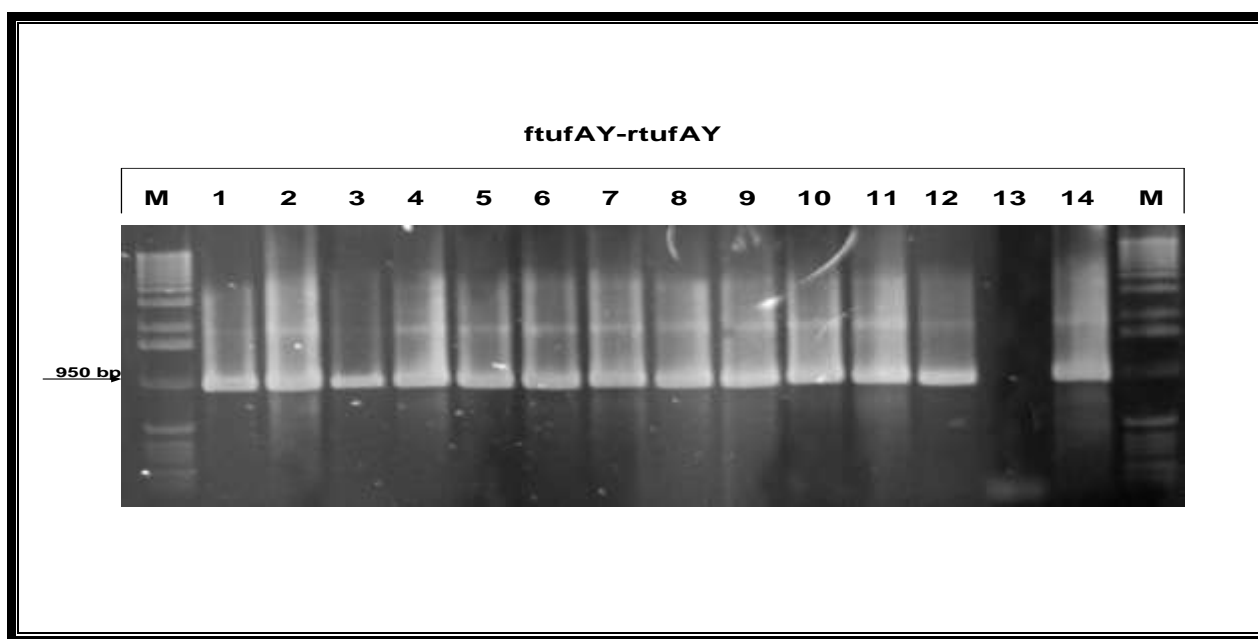
На Слика 22 и Слика 23 се прикажани флуоресцентно обоени електрофореграми на 1% агарозен гел, кај винова лоза во текот на двете испитувани сезони, 2006/07.



Слика 22. Резултат од електрофорезата во 1% агарозен гел на PCR амплифицираните продукти на фитоплазматскиот ген кај примероци од винова лоза колекционирани во сезоната 2006. За умножување беше користен прајмерскиот пар R16 P1P7 - M1B6.

- 1 - примерок, *смедеревка*, Неготино/06.
- 2 - примерок, *врапец*, Неготино/06.
- 3 - примерок, *италијански ризлинг*, Неготино/06.
- 4 - примерок, *белан*, Неготино/06.
- 5 - примерок, *'ркцатели*, Неготино/06.
- 6 - примерок, *шардоне*, Кавадарци/06.
- 7 - примерок, *белан*, Струмица/06.
- 8 - примерок, *смедеревка*, Радовиш/06.
- 9 - примерок, *врапец*, Радовиш/06.
- 10 - примерок, *бургундец*, Штип/06.
- 11 - примерок, *смедеревка*, Штип/06.
- 12 - примерок, *бургундец* црн, Штип/06.
- 13 - примерок, *бургундец*, Штип/06.
- 14 - примерок, *афус али*, Штип/06.
- 15 - примерок, *рајнски ризлинг*, Штип/06.
- 16 - примерок, *врапец*, Штип/06.
- 17 - примерок, *шардоне*, Велес/06.
- 18 - негативна контрола, дејонизирана вода.
- 19 - AY1, стандарден сој на фитоплазма (од лабораторијата CRA во Италија).
- M - стандарден сој за одредување на молекулската маса (1kb DNA ladder) со следнава големина (одгоре-надолу): 10.000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 700, 500, 300 базни парови.

Сите позитивни примероци кои беа детектирани со умножување на фитоплазматскиот 16S rDNA ген, понатаму беа испитувани со анализа на специфичниот ген за фитоплазмата *Bois noir*, генот за елонгацискиот фактор Tu (*tuf* ген). За директниот PCR беше користена универзалната група на прајмери за *tuf* генот, ftuf1-rtuf1. По директниот PCR, задолжително следувааше вгнезден (*nested* PCR), со прајмерскиот пар ftufAY-rtufAY, кој даде очекувани електрофоретски линии на агарозниот гел со должина од 950 bp (Слика 23).



Слика 23. Резултат од електрофорезата во 1% агарозен гел на PCR амплифицираните продукти на фитоплазматскиот *tuf* ген кај примероци од винова лоза колекционирани во сезоната 2006. За умножување беше користен прајмерскиот пар FTufAY-RTufAY.

M - стандарден сој за одредување на молекулската маса

1 - примерок, *смедеревка*, Неготино/06.

2 - примерок, *врапец*, Неготино/06.

3 - примерок, *белан*, Неготино/06.

4 - примерок, *шардоне*, Кавадарци/06.

5 - примерок, *белан*, Струмица/06.

6 - примерок, *смедеревка*, Радовиш/06.

7 - примерок, *врапец*, Радовиш/06.

8 - примерок, *бургундец*, Штип/06.

9 - примерок, *смедеревка*, Штип/06.

10 - примерок, *бургундец*, Штип/06.

11 - примерок, *врапец*, Штип/06.

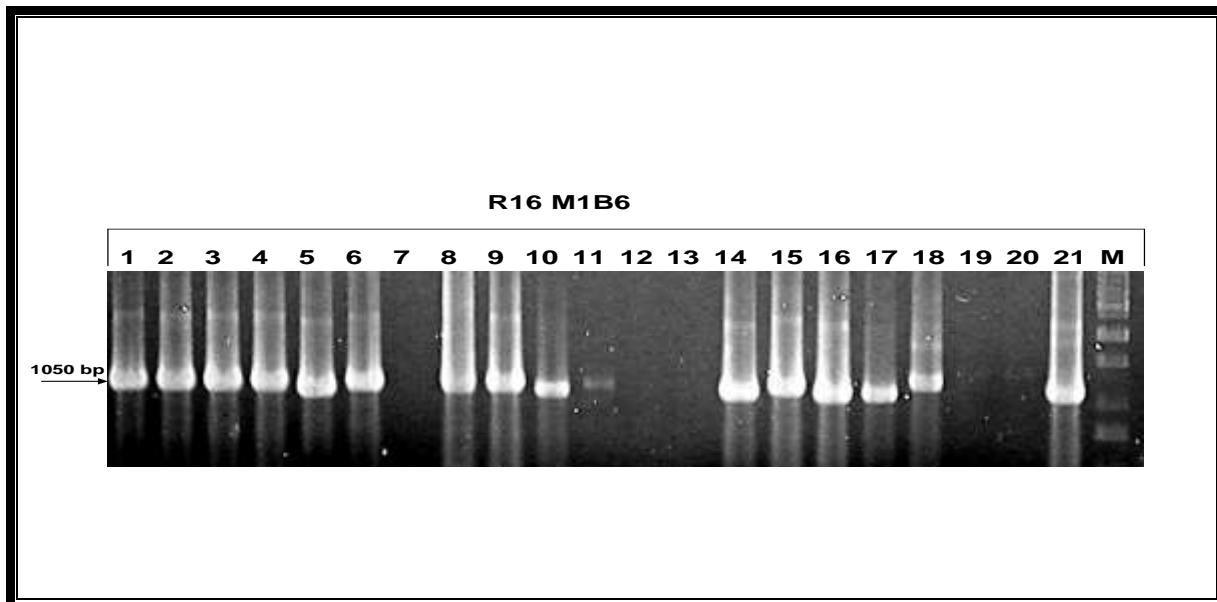
12 - примерок, *шардоне*, Велес/06.

13 - негативна контрола, дејонизирана вода.

14 - AY1, стандарден сој на фитоплазма (од лабораторијата CRA во Италија).

M - стандарден сој за одредување на молекулската маса (1kb DNA ladder) со следнава големина (одгоре-надолу): 10.000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 700, 500, 300 базни парови.

Лабораториските анализи кои се направени на колекционираниот материјал од 2007 година, со универзалната група на прајмери R16 P1P7 - M1B6, ги потврдија истите резултати за присуството на фитоплазмите кај различни сорти на винова лоза (Слика 24).



Слика 24. Резултат од електрофорезата во 1% агарозен гел на PCR амплифицираните продукти на фитоплазматскиот ген кај примероци од винова лоза колекционирани во сезоната 2007. За умножување беше користен прајмерскиот пар P1P7 - M1B6.

- 1 - примерок, *смедеревка*, Неготино/07.
- 2 - примерок, *врапец*, Неготино/07.
- 3 - примерок, *белан*, Неготино/07.
- 4 - примерок, *шардоне*, Кавадарци/07.
- 5 - примерок, *врапец*, Струмица/07.
- 6 - примерок, *врапец*, Радовиш/07.
- 7 - примерок, *смедеревка*, Радовиш/07.
- 8 - примерок, *бургундец црн*, Штип/07.
- 9 - примерок, *смедеревка*, Штип/07.
- 10 - примерок, *бургундец црн*, Штип/07.
- 11 - примерок, *врапец*, Штип/07.
- 12 - примерок, *афус али*, Штип/07.
- 13 - негативна контрола, дејонизирана вода.
- 14 - примерок, *смедеревка*, Кавадарци /07.
- 15 - примерок, *врапец*, Штип/07.
- 16 - примерок, *врапец*, Струмица/07.
- 17 - примерок, *бургундец црн*, Штип/07.
- 18 - примерок, *шардоне*, Велес/07.
- 19 - примерок, *каберне совиньон*, Велес/07.
- 20 - негативна контрола, дејонизирана вода.
- 21 - STOL C – стандарден сој на фитопlasма (од лабораторијата CRA во Италија).
- M - стандарден сој за одредување на молекулската маса (1kb DNA ladder) со следнава големина (одгоре-надолу): 10.000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 700, 500, 300 базни парови.

5.3. Полиморфизам на должината на рестрикциските фрагменти (RFLP), на фитоплазматскиот 16S rDNA ген

По амплификацијата со прајмерскиот пар M1B6, IF1R1 и парот за *tuf* генот Ftuf-Rtuf AY, беше направена дигестија со три рестрикциски ендонуклази: *TaqI*, *Tru9I* (=MseI) и *HpaII*.

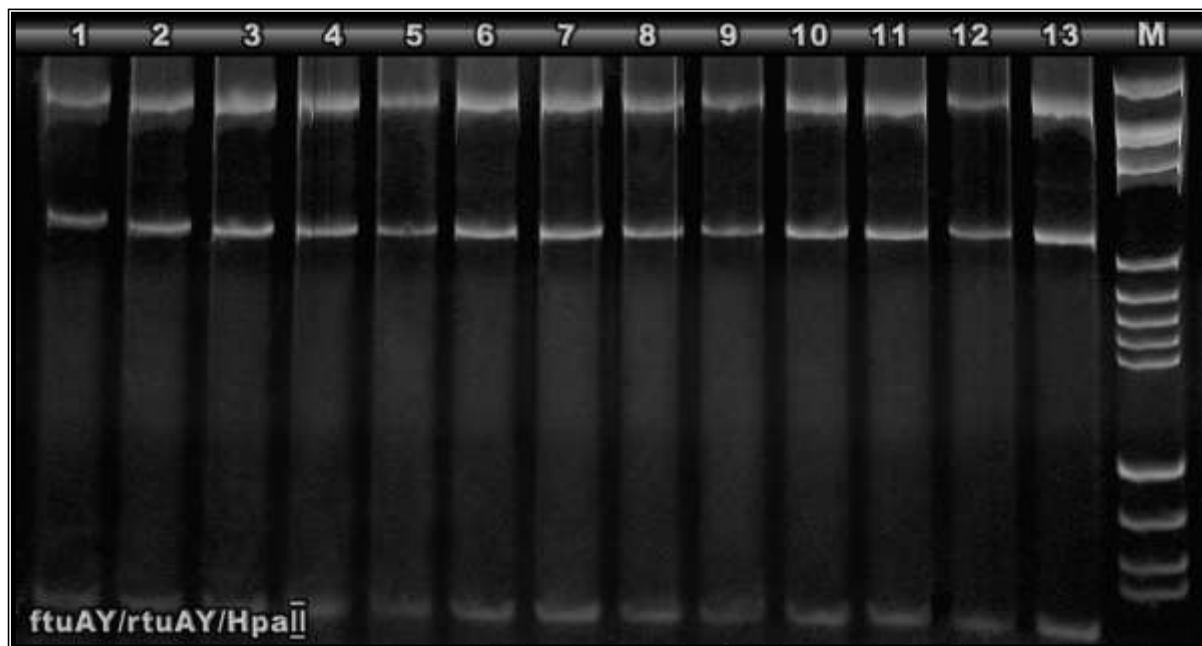
M1B6 амплифицираните позитивни примероци беа дигестирани со рестрикцискиот ензим *TaqI*, за потврдување на типот на фитоплазмата.

IF1R1 амплифицираните позитивни примероци беа дигестирани со рестрикцискиот ензим *Tru9I* (=MseI).

За специфичниот *tuf* ген, ампликоните беа дигестирани со рестрикцискиот ензим *HpaII*, со кој добиените профили извршија типизација на групата на фитоплазмата *Bois noir*. На последната позиција секогаш беше аплициран маркер со позната молекулска маса pBR322 (Invitrogen), како стандард за одредување на молекулската маса на примероците. Добиените рестрикциски профили беа споредени со референтните изолати, AY1 и STOL C (16SrXII-A).

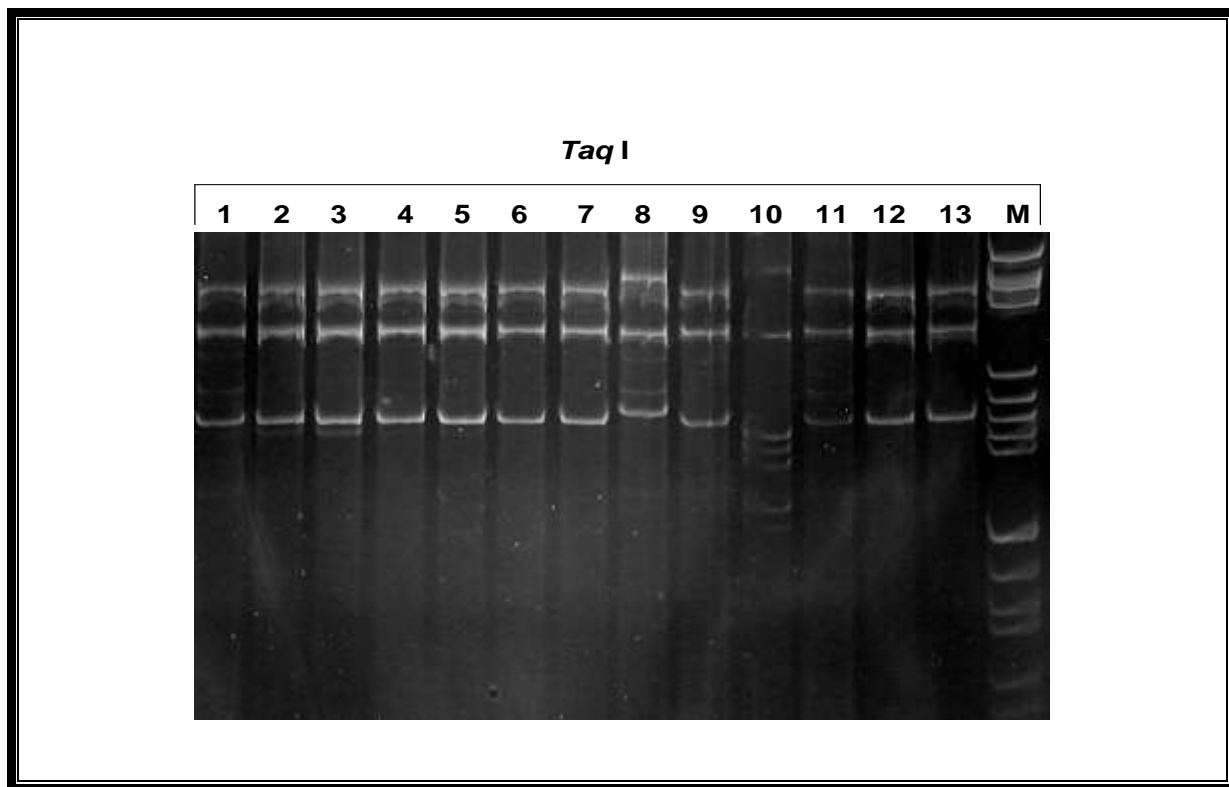
Добиените рестрикциски профили се прикажани на сликите 25-28.

Кај сите тестирани позитивни примероци, добиените рестрикциски профили беа идентични со користените референтни изолати AY1 и STOL C – столбур групата (двата изолати од 16SrXII-A подгрупата).



Слика 25. Рестрикциски профили на специфичните *tuf* ампликони, добиени со помош на *Hpa*II рестрикцискиот ензим, визуелизирани во 13% полиакриламиден гел.
 1-12 примероци од винова лоза колекционирани во сезоната 2006
 13 - AY1, референтен изолат (E. Boudon Padieu, Dijon, France)
 M - pBR322 маркерот е со 15 фрагменти со следнава должина (во bp): 587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124, 123, 104, 89, 80.

Позитивните примероци добиени со универзалната група на прајмери, R16 M1B6, беа дигестирани со ензимот *Taq*I. Добиените рестрикциските профили на 13% полиакриламиден гел се прикажани на Слика 26.



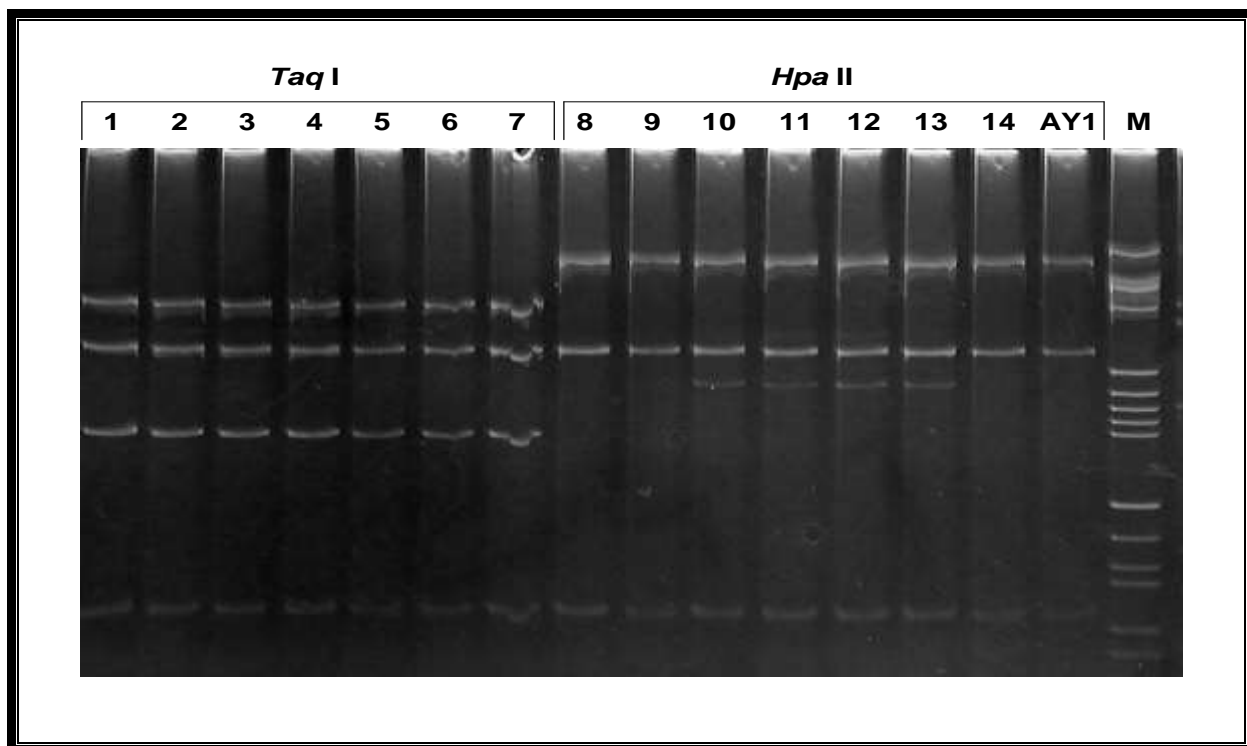
Слика 26. Рестрикциски профили (на ампликоните добиени со nested PCR-от, со прајмерскиот пар M1B6), добиени со помош на *TaqI* рестрикцискиот ензим, визуелизирани во 13% полиакриламиден гел.

1-12 примероци од винова лоза колекционирани во сезоната 2006

13 - AY1, референтен изолат (E. Boudon Padieu, Dijon, France)

M - pBR322 маркерот е со 15 фрагменти со следнава должина (во bp): 587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124, 123, 104, 89, 80.

Позитивните примероци кои беа добиени во сезоната 2007, со универзалната група на прајмери R16 M1B6 и со прајмери специфични за *tuf* генот Ftuf-Rtuf AY, беа дигестирани со ензимите *TaqI* и *HpaII*. Добиените рестрикциските профили на 13% полиакриламиден гел се прикажани на Слика 25.



Слика 27. Рестрикциски профили на M1B6 и специфичните *tuf* ампликони, добиени со помош на *Taq*I и *Hpa*II рестрикцискиот ензим, визуелизирани во 13% агарозен гел.

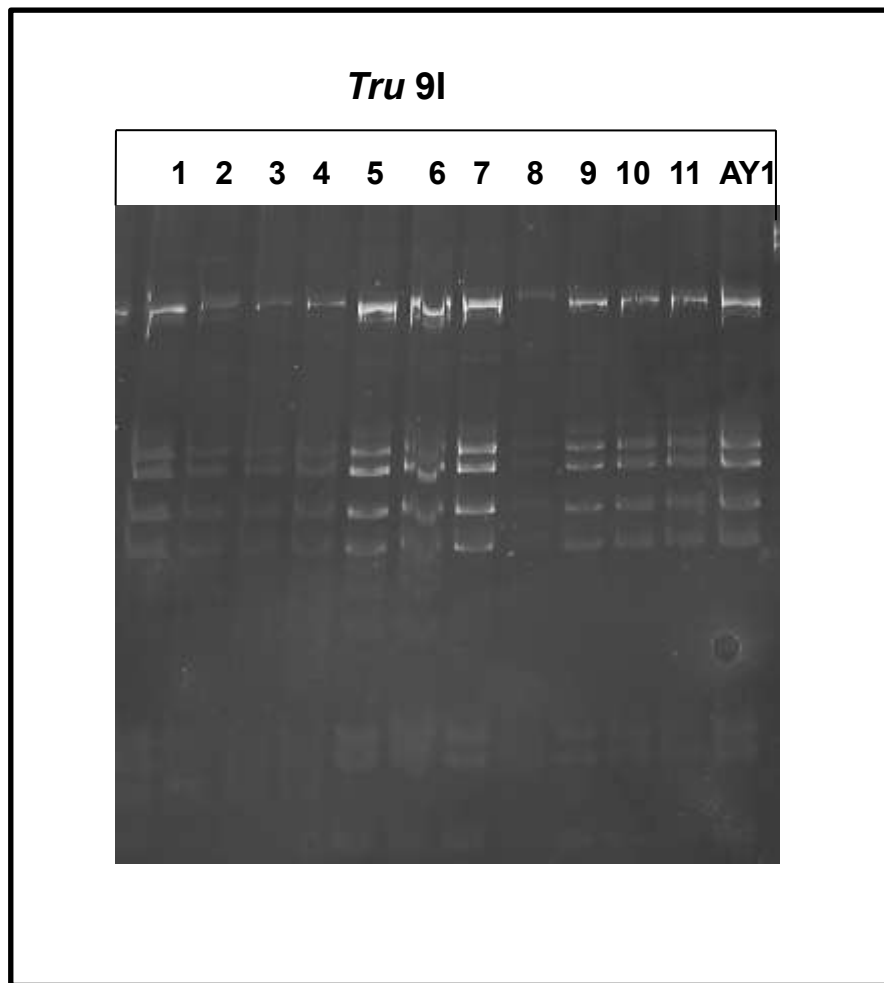
1-7 примероци од винова лоза колекционирани во сезоната 2007 – дигестија извршена со *Taq*I рестрикцискиот ензим

8-14 примероци од винова лоза колекционирани во сезоната 2007 – дигестија извршена со *Hpa*II рестрикцискиот ензим

AY1, референтен изолат (E. Boudon Padieu, Dijon, France)

pBR322 маркерот е со 15 фрагменти со следнава должина (во bp): 587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124, 123, 104, 89, 80.

Позитивните примероци кои беа добиени во двете испитувани сезони со специфичната група на прајмери R16 IF1R1 (специфична група на прајмери за 16Sr I и за 16Sr XII), беа дигестирани со ензимот *Tru* 9I. Добиените рестрикциските профили на 13% полиакриламиден гел се прикажани на Слика 28.



Слика 28. Рестрикциски профили (на ампликоните добиени со nested PCR-от, со прајмерскиот пар IF1R1), добиени со помош на *Tru 9I* рестрикцискиот ензим, визуелизирани во 13% агарозен гел

1-11 примероци од винова лоза колекционирани во сезоната 2006 – дигестија извршена со *Tru 9I* рестрикцискиот ензим

- 1 - примерок, *смедеревка*, Неготино/06
- 2 - примерок, *врапец*, Неготино/06
- 3 - примерок, *белан*, Неготино/06
- 4 - примерок, *шардоне*, Кавадарци/06
- 5 - примерок, *белан*, Струмица/06
- 6 - примерок, *смедеревка*, Радовиш/06
- 7 - примерок, *бургундец*, Штип/07
- 8 - примерок, *смедеревка*, Штип/07
- 9 - примерок, *рајнски ризлинг*, Штип/07
- 10 - примерок, *врапец*, Штип/07
- 11 - примерок, *шардоне*, Велес/07

AY1, референтен изолат (E. Boudon Padiou, Dijon, France)

Сите профили добиени при дигестија на позитивните примероци со трите рестрикциски ендонуклази: *TaqI*, *Tru9I* (= *MseI*) и *HpaII*, го потврдија присуството на фитоплазмата *Bois noir* (столбур, 16SrXII-A), тип II (VKII).

Збирните резултати од сите направени анализи се прикажани во Табела 7.

Табела 7. Резултати за раширеноста на фитоплазмата *Bois noir* по локалитети и сорти добиени со анализа на примероците од винова лоза во сезоната 2006/07

Регион	Локалитет	Година на испитување	Сорта	PCR-RFLP		
				M1/B6 IF1R1	Ftuf/Rtuf AY	RFLP
Неготино	Ило Виларов	2006	италијански ризлинг	-	-	/
		2006/2007	смедеревка	+	+	BN(VKII)
		2006/2007	вранец	+	+	BN(VKII)
		2006/2007	белан	+	+	BN(VKII)
		2006	'ркцатели	-	-	/
		2006	жилавка	+	+	BN(VKII)
	Дуброво	2006/2007	'ркцатели	-	-	/
		2006/2007	траминец бел	-	-	/
		2006/2007	кратошија	-	-	/
		2006	смедеревка	-	-	/
Кавадарци	П.Е. Љубаш	2006/2007	мускат италиа	-	-	/
		2006/2007	афус али	-	-	/
		2006/2007	смедеревка	-	-	/
		2006/2007	шардоне	+	+	BN(VKII)
Струмица	Хамзали	2006	белан	+	+	BN(VKII)
		2006/2007	вранец	+	+	BN(VKII)
		2006	'ркцатели	-	-	/
		2006	смедеревка	-	-	/
		2007	викторија	-	-	/
Радовиш	Добридол	2006	пловдина	-	-	/
		2006	смедеревка	+	+	BN(VKII)
		2006/2007	рајнски ризлинг	-	-	/
		2006/2007	вранец	+	+	BN(VKII)
Штип	Каваклија	2006	рајнски ризлинг	-	-	/
		2006/2007	бургундец црн	-	-	/
		2006	афус али	-	-	/
	Ежово	2006/2007	афус али	-	-	/
		2006/2007	вранец	+	+	BN(VKII)
	Три Чешми	2006/2007	смедеревка	+	+	BN(VKII)
		2006	рајнски ризлинг	-	-	-
		2006/2007	бургундец црн	+	+	BN(VKII)
	Врсаково	2006/2007	вранец	+	+	BN(VKII)
		2006/2007	вранец	+	+	BN(VKII)
Куманово	Табановце	2007	вранец	-	-	/
		2007	бургундец црн	-	-	/
	Петрличани	2007	шардоне	-	-	/
Велес	Сопот	2006/2007	шардоне	+	+	BN(VKII)
		2006/2007	каберне совиньон	-	-	/
	Витанци	2006	бургундец црн	-	-	/
		2006	каберне совиньон	-	-	/
		2006	вранец	-	-	/

6. ДИСКУСИЈА

Традицијата за одгледување на виновата лоза во Република Македонија е долгогодишна и таа во текот на својот развој доживувала големи варирања во однос на површина и количество на произведено грозје и вино. Во текот на целиот период на развој на виновата лоза, болестите се неизбежен дел и постојано се појавуваат во различен период од годината и со различен интензитет.

Виновата лоза, како и секоја останата земјоделска култура, се соочува со проблеми во текот на одгледувањето, поради појавата на голем број на болести, штетници и плевели, кои нанесуваат сериозни загуби во приносот. Како резултат на истражувањата кои се правени со години наназад, природата на повеќето болести е добро проучена и постојат мерки за заштита од нив, меѓутоа кај извесни патогени промени, сузбивањето е тешко или пак природата на промените е од непознато потекло. Интензивната појава на болестите кај виновата лоза, започнала со внесувањето на дивата америчка лоза за подобро калемење, но со тоа и за прв пат дошло до внесување на болестите кај лозата од типот: пламеница предизвикана од *Plasmopora viticola* Berl & De Toni и пепелница предизвикана од *Uncinula necator* (Schw. Burr).

Појавата на болестите од типот на жолтилата кај виновата лоза (*Vitis vinifera* L.), недоволната испитаност на нивните причинители и големите економски штети што ги причинуваат во лозовите насади во нашата земја, сигнализираа потреба од испитување на етиологијата на заболувањата. Појавата на фитоплазматските заболувања во последната декада сè повеќе буди интерес кај научниците-истражувачите за оваа група на растителни патогени како во применетите, но и во фундаменталните истражувања.

Секако дека тие постоеле уште многу одамна (1967 год.), но поради потешкотиите во нивната детерминација многу доцна почнале да се објавуваат подетални податоци за нивната значајност и големите економски штети кои ги прават конкретно во лозарството.

Освен лабораторијата за Заштита на растенијата при Земјоделскиот факултет, Универзитет „Гоце Делчев“ во Штип, не постои друга лабораторија во Македонија која се занимава со проучување на оваа група на патогени, предизвикувачи на голем број на растителни болести во светски рамки. Како резултат на развојот на модерните молекуларно-биолошки методи, овозможена е брза и точна детекција и идентификација на фитоплазмите.

Како резултат на истражувањата спроведени во текот на 2006/07 година, направивме чекор напред во нашите сознанија за фитоплазмите а воедно и ја ставивме Македонија на листата на земји каде е присутна столбур фитоплазмата.

Беше извршена теренска анализа на одредени предходно маркирани лозови површини, континуирано беше следен симптоматолошкиот аларм, за да на крај биде потврден со лабораториски молекуларни анализи и да ни сигнализира дека фитоплазмите постојат и се шират и во Македонија и дека треба да се преземат сериозни мерки за спречување на нивното раширување.

6.1. Симптоматологија

Фитоплазмите се причинители на голем број деструктивни болести кај виновата лоза. Тоа се прокариотски организми кои живеат во флоемските садови кај растенијата и се предизвикувачи на повеќе од 700 различни растителни болести кај овошките, виновата лоза, како и кај некои едногодишни и повеќегодишни растенија. Како домаќини на фитоплазмите можат да бидат и голем број на плевелни растителни видови, кои се најчести извори на зараза (Martelli & Boudon-Padieu, 2006).

Поради неможноста фитоплазмите да се одгледуваат на хранлива подлога, во почетокот за нивна класификацијата биле користени само симптоматологијата, домаќинот и географската распространетост (австралиско жолтило кај виновата лоза, европско жолтило кај коскестите овошки, италијанско жолтило кај зелката).

Симптомите кај виновата лоза заболена од фитоплазмозите подразбираат збир на различни промени во однос на здравите чокоти. Всушност, било констатирано дека пупките кај ластарите и деловите на чокотот заразени со фитоплазмите (без разлика на видот на фитоплазмите), на пролет потеруваат со задоцнување од седум до десет дена, а кај некои ластарите воопшто и не се развиваат. Ова одложено потерување на вегетацијата било забележано од повеќе (Doi et al., 1967, Rumbos, 1989, Credi et al., 1990, Credi & Santucci, 1991, цитирани кај Martelli & Boudon-Padieu, 2006).

Овој симптом, по правило, секогаш се јавува кај фитоплазматски заболениите чокоти, и покрај тоа што може да се појави и како резултат на голем број други фактори, како што се: измразнување, неповолни временски услови за време на оформувањето на лозанката, присуство на други патогени, поради што не може да се земе како дијагностички симптом (Krake et al., 1999).

Промената на ластарите во вид на заостанување во порастот, скратување на интернодиите, недоволно задрвенување и измрзнување на таквите ластари во текот на зимскиот период се типични симптоми забележани од страна на голем број истражувачи низ лозовите полиња во светот (Caudwell et al., 1957, цитирани кај Martelli & Caudwell, 1993, Bovey & Martelli, 1992, Girolami et al., 1989, Quacquarelli & Barba, 1992, Martelli & Caudwell, 1993, Boudon-Padieu, 1999, Krake et al., 1999). Слично е и со симптомите кај листовите, цветовите и гроздовите.

Со споредувањето на забележаните симптоми со идентификуваните групи на фитоплазми не е воспоставена врска меѓу фитоплазмите од одредена група и симптомите кои ги предизвикуваат. Ова е потврдено од страна на голем број автори кои се обиделе да утврдат врска меѓу идентичните или многу сличните фитоплазматски симптоми (Daire et al., 1993; Bertaccini et al., 1995; Boudon-Padieu, 2000; Angelini et al., 2001). Врз основа на овие истражувања може да се каже дека според симптомите може да се претпостави дека се работи за фитоплазматско заболување, но не може да се каже за која фитоплазма станува збор.

Патоген. Maixner и сораб. во 1995, со помош на PCR и RFLP, во лози со симптоми на пожолтување (Vergilbungskrankheit - VK), во плевелот *Convolvulus arvensis* и во цикадите *Hyalestes obsoletus*, утврдиле фитоплазми од групата на столбур и со тоа заклучиле дека причинител на Vergilbungskrankhet во Германија, односно *Bois noir*, е фитоплазмата столбур која е сродна со фитоплазмите на жолтиците кај астрите. Таа се наоѓа и во плевелни растенија, како *Convolvulus arvensis*, *Urtica dioica*, *Calistega*, како и во растенијата од фамилијата *Solanaceae* (компир, домати, тутун, пиперка и други). Таа се пренесува од цикадата *Hyalestes obsoletus*, која не ја пренесува фитоплазмата на *Flavescence dorée*.

Теренските анализи на површините под винова лоза покажаа симптоми во општиот изглед на растението, кои се однесуваа на еластичноста и промената на нормалната боја и обликот на листовите. Зависно од сортата, растенијата ја менуваат бојата на листовите во црвена или жолта. На заразените чокоти беше констатирана и промена во формата на листовите, свиткување на листовите навнатре и добивање на триаголен изглед. Таквите листови се многу крути. На ластарите беа забележани зелени недоволно задрвенети зони. Кај таквите чокоти гроздовите се исушени, а доколку има останато некоја бобинка таа е со изменет вкус. Најчесто зависно од стадиумот на болеста доаѓа до потполно отсуство на плодовите.

Следејќи ги гореспоменатите симптоми е утврдено дека болеста се проширува и засилува од година во година, а во крајниот стадиум на болеста чокотите се сушат и умираат. Ова е случај кај некои површини под винова лоза на територијата на Република Македонија.

Резултатите од следењето на присуството на фитоплазмите во 7 региони и 13 виногорја на територијата на Република Македонија, во периодот од 2006 до 2008, покажаа дека фитоплазмите се присутни во сите испитувани виногорја.

Само со теренска анализа на симптоматичните насади неможе да се докаже присуството на фитоплазмите. Во голем број на прегледи забележавме лози кои покажуваа симптоми само на еден ластар. Со анализа на целата лозанка (лист, ластар и грозд), во најголем број на случаи забележавме дека целата лоза е здрава, има убави големи грzdови а само едниот ластар е симптоматичен. Тие случаи се резултат на повреда на ластарот од инсект (*Stictocephala bisonia*) или човечки фактор (напукнување на ластарот).

Забележаниот феномен на „зздравување“ на заболениите лози од фитоплазмите (Caudwell, 1961, цитирано кај Martelli and Boudon-Padieu, 2006; Osler et al, 1993; Osler et al., 2003) не беше констатиран во текот на нашето истражување. Двегодишните анализи покажаа дека симптоматичните лози кои ги лоциравме во првата година од истражувањето, во втората година беа со исти симптоми или со делумно зголемен интензитет на инфекција.

6.2. Методолошки пристап за детекција и идентификација на фитоплазмите кај различни сорти на винова лоза

Од расположливите техники за изолација на вкупната ДНК од лисната нерватура беше избрана модифицираната СТАВ (цетил триметил амониум бромид) екстракција (Angelini et al., 2001), поради високиот принос на ДНК, минималната можност за контаминација со протеини и други инхибитори на PCR реакцијата.

Поради неможноста на фитоплазмите да се култивираат на хранлива бактериска подлога, изборот на PCR-RFLP техниката за детекција и типизација на фитоплазмите во овој труд се покажа со висока сензитивност и специфичност. Денес, методите на молекуларна детекција се најосетливи и најпрецизни методи за идентификација на фитоплазмите кај сите култури, па и кај виновата лоза (Martelli and Boudon-Padieu, 2006).

Овие методи се базираат на особините на геномот (Seemüller et al., 1998) и затоа се многу погодни за идентификација, карактеризација, филогенетска анализа, варијабилност и класификација на фитоплазмите.

Идентификацијата на колекционираниот материјал за анализа во текот на 2006 и 2007 година беше направена со директен и вгнезден (nested) PCR.

Најчесто користена група на прајмери беше P1/P7 универзалната група на прајмери за детекција на фитоплазмите (Deng and Hiruki, 1991; Schneider et al., 1995). Овие групи на прајмери овозможуваат брза детекција на фитоплазмите врз основа на 16S рибозомалната ДНК, која е универзална за сите фитоплазми.

Во детекцијата на фитоплазмите овој универзален пар на прајмери се користи сам, а за зголемување на осетливоста се користат и други прајмери во nested PCR-от (Paltrinieri et al., 2000; Batlle et al., 2000; Davis and Dally, 2001; Borth et al., 2002; Angelini et al., 2003).

Типизацијата на фитоплазмите беше направена со RFLP анализа на позитивните M1B6 ампликони, со помош на *TaqI*, *Tru9I* (=MseI) и *HpaII*. RFLP анализата со употреба на *TaqI* рестрикциски ензим се користи често за диференцијација и идентификација на фитоплазми, не само кај виновата лоза туку и кај други растенија (Martini et al., 2002; Botti and Bertaccini, 2003).

Рестрикциската анализа на сите тестирани примероци од нашата земја даде идентични рестрикциски профили. Споредбата на добиените рестрикциски профили со профилите на референтните фитоплазматски изолати го потврди присуството на фитоплазмата BN од подгрупата столбур (16Sr XII-A).

6.3. Појава и застапеност на фитоплазмите кај виновата лоза на територијата на Република Македонија

Фитоплазмите кои предизвикуваат заболувања кај виновата лоза припаѓаат на различни групи, и тоа: 16SrI, 16SrII, 16SrIII, 16SrV, 16SrVII, 16SrX и 16SrXII (Gibb et al., 1999, Varga et al., 2000a; Boudon-Padieu, 2003).

Со употреба на PCR-RFLP техника за идентификација на фитоплазмите, во текот на 2006 и 2007 година, во сите испитувани региони и виногорја е потврдено присуството на фитоплазмата столбур од рибозомалната подгрупа 16Sr XII-A.

Кај виновата лоза оваа група на фитоплазми била поврзана со болеста која е позната под името *Bois noir*. Оваа фитопlasма е раширена речиси во сите земји каде се одгледува виновата лоза (Boudon-Padieu, 2000), како и во сите земји околу Македонија: Србија (Kuzmanovic et al., 2007), Хрватска (Šeruga et al., 2000), Бугарија (Avramov Z., 2008), Албанија (EPPO Reporting Service, 2006) и Грција (Davis R.E., 1997).

Ситуацијата со присуството на фитоплазмата *Flavescence dorée* е алармантна кај нашиот близок сосед Србија (Duduk et al., 2004). Се работи за карантинска болест која се пренесува единствено со векторот *Scaphoideus titanus*, кој живее и се храни единствено на виновата лоза и ја пренесува болеста од една на друга лозанка (Davis & Dally, 2001, Boudon-Padieu, 2003).

Особено треба да се врши понатамошна строга контрола на влез на саден материјал во Македонија од Србија, и да се внимава на појавата на *Scaphoideus titanus* Ball, кој не се знае кога и како може да пристигне во Македонија поради фактот дека не постои воздушна бариера, но повеќе поради причини што јајцата на овој инсект вектор може лесно и без знаење да се пренесат со несертифициран и недоволно контролиран саден материјал.

Исто така, особено треба да се внимава и на формирањето на новите калеми. Инфективната природа на фитоплазмите била потврдена преку создавање на нови калеми, која за прв пат била докажана преку заболел калем со *Flavescence dorée* од страна на Caudell, 1957 (цитирано кај Martelli and Boudon-Padieu, 2006). Пренесувањето на фитоплазмите преку калемењето, било докажано со калемење на најосетливите сорти *бургундец црн*, *пловдина* и *шардоне*.

Нашите фармери, одгледувачи на винова лоза кои сами ги создаваат калемите, треба да бидат доволно информирани и да внимаваат при создавањето на калемите да одбираат здрави лози, за да го спречат раширувањето на фитоплазмите.

Кај нас, присуството на фитоплазмата *Bois noir* сеуште е во контролирани услови, поради тоа што се пренесува со инсект-вектор, *Hyalestes obsoletus* Signoret, кои сеуште не е пронајден кај нас. Оваа фитопlasма има големо економско значење но сепак не е карантинска затоа што лозата е последна култура за векторите т.е. се пренесува од плевелната вегетација на лозата а не се пренесува од една лоза на друга. Значи, инсектите живеат во плевелната флора, а повремено надлетуваат и меѓу лозовите листови и ја пренесуваат инфекцијата.

Оваа група на патогени во Македонија била забележана уште во 70-тите години на минатиот век, но не била докажана со молекуларни методи, туку била следена само симптоматологијата (Пејчиновски, Ф., усна комуникација).

Митрев С. и сораб. во 2003 го потврдиле присуството на фитоплазмите само во лозовите насади во околината на Скопје и Велес, и тоа само кај две сорти на винова лоза: *шардоне* и *вранец*.

Истражувањата направени при изработката на овој магистерски труд го потврдија присуството на фитоплазмите во сите испитувани виногорја и кај сите испитувани сорти на винова лоза. Со помош на методата полиморфизам на должината на рестрикциските фрагменти (RFLP), извршивме типизација на присутните фитоплазми и го утврдивме присуството на *Bois noir*, тип II (VKII). Овој тип на фитопlasма го има кај родовите: *Convolvulus* (VKII) и *Calystega* (VKI и VKII)

Сеуште постојат голем број на отворени прашања во проблематиката со фитоплазмите на нашата територија. Причините за појавата на фитоплазмите кај нас и начинот на нивното пренесување сеуште не се докажани.

Следните чекори би биле насочени кон проучување на плевелната вегетација, присуството на инсектите вектори како и контрола на младите поставени лозови насади.

7. ЗАКЛУЧОК

Врз основа на симптоматолошко-етиолошките испитувања кај виновата лоза со појава на симптоми на црвенила, односно жолтила, и истражувањата за присуството и раширеноста на овие заболувања на виновата лоза во Република Македонија, кои се опишани во рамките на оваа магистерска работа, можат да се изведат неколку општи заклучоци:

1. Кај чокотите од виновата лоза, кои се заболени од фитоплазмози, се појавуваат различни типови на патолошки промени, кои варираат во зависност од растителниот орган, фенофазата на виновата лоза, сортата и староста на чокотите во времето на инфекцијата;
2. Пупките кај ластарите на заболените чокоти потеруваат за седум до десет дена подоцна, а кај ластарите кои се во фаза на сушење и умирање, пупките во пролет воопшто и не се развиваат;
3. Фитоплазматските заболувања се најштетни кај цветовите, гроздовите и ластарите, а притоа директно дејствуваат на приносот на гроздовите и виталноста на заболените чокоти;
4. Ластарите кај заболените чокоти имаат скратени интернодии, заостануваат во растот и добиваат цик-цак изглед. Поради тоа, тие недоволно задрвенуваат, се свиваат по земјата и при слаби и незначителни мразеви во текот на зимскиот период измрзнуваат;
5. Листовите кај заболените чокоти на почеток се бледи, а потоа стануваат хлоротични и се свиткуваат кон внатрешната страна. Оваа дисколорација на листовите кај белите сорти преминува во „златно жолтило“, а кај црните сорти во темно или светло „црвенило“. Ткивото на листовите, посебно околу и помеѓу нерватурата, често пати може да биде зафатено од некроза. Заболените листови најчесто опаѓаат предвремено, некаде кон средината на вегетацијата;

6. Цветовите кои се формираат на заболените ластари, односно на чокотите, делумно или потполно некрозираат и се сушат по прецветувањето. Доколку цветовите на заболените ластари останат по прецветувањето, тогаш се формираат слабо развиени гроздови чии бобинки се спурени, како гума, се сушат и имаат горчилав и кисел вкус;
7. Интензитетот на појавата на болести кај чокотите со текот на времето се зголемува, така што постепено сите надземни делови заболуваат и таквите чокоти се сушат и изумираат;
8. Интензитетот на симптомите зависи од осетливоста на сортата. Во текот на двегодишното истражување беше забележано дека најинтензивни симптоми има кај сортата *шардоне*, со интензивна златно-жолта боја на листовите, со најизразено заостанување на задрвенувањето на ластарите, со некрозирање на листовите и изумирање на заболените чокоти. Исто така, кај сортата *вранец* беше забележано интензивно поцрвенување на листовите, свиткување навнатре, лесно откинување и отпаѓање пред крајот на вегетацијата и изостанување на задрвенувањето на ластарите. Кај останатите сорти: *смедеревка*, *црн бургундец*, *италијански ризлинг*, *ркцатели*, *белан*, интензитетот на заболување на листовите, како и незадрвенувањето на ластарите, значително варираше;
9. Не беше забележано повлекување на симптомите од чокотите или целото растение (зависно од интензитетот на заболувањето) во текот на прегледот на маркираните симптоматични делови во втората година од истражувањето;
10. Присуството на фитоплазмите кај заболените лозови насади беше регистрирано со различен интензитет во сите прегледани региони под винова лоза. Интензитетот на заразата се движеше од 10 до 60 %, а како најосетливи сорти беа сортите *шардоне* и *вранец*;
11. Процентот на некрозирање и сушење на заболените чокоти на винова лоза беше најмал кај сортата *смедеревка* (10%), а најголем кај сортата *шардоне* (50-70%);

12. Фитоплазмите кај виновата лоза во голема мера го намалуваат приносот на грозје, што е во корелација со зголемувањето на интезитетот на заразата. Намалувањето на приносот на грозје во просек се движеше од 10% кај сортите *италијански ризлинг* и *'ркцатели* до 70% кај сортата *шардоне*. Посебно голем процент на губење во приносот (преку 70%) беше утврден кај сортата *шардоне* (во насадот Сопот - Велес, во сезоната 2007);
13. Фитоплазмите можат лесно да се препознаат пред крајот на вегетацијата по типичните симптоми: незадрвенување на ластарите, еластичност на ластарите и нивно виткање по земја, промена на бојата и формата на листовите, нивно предвременно опаѓање, некрозирање на листовите и цветовите и изумирање на чокотите. Овие типични симптоми за фитоплазмите можат да се појават и при напукнување или повреда на ластарите (било да е од човечки фактор или од инсектите). Тогаш ластарот од местото на повредата дава исти симптоми на листовите како фитоплазматското заболување. Во случај кога само еден ластар од целото растение покажува симптоми, а сите останати нормално се развиваат, тогаш треба да се провери каде има повреда на ластарот. Ова не мора секогаш да е случај, може инфекцијата да е во почетна фаза па да е зафатен само еден дел од лозата;
14. Со полимеразно верижна реакција (PCR-Polimerase chain reaction) беше докажано присуството на фитоплазмите во примероците од винова лоза со опишаните симптоми. Умножувањето на фитоплазматскиот ген за 16S rDNA го потврди присуството на фитоплазмите во симптоматичните примероци од винова лоза од сортите: *шардоне*, *вранец*, *смедеревка*, *белан*, *бургундец црн*.
15. Рестрикциска анализа на умножените фрагменти во споредба со рестрикциските стандардни соеви на фитоплазми го типизира присуството на фитоплазмите од 16Sr XII-A или подгрупата столбур;
16. Со помош на RFLP анализата го потврдивме присуството на *Bois noir* или фитоплазмата столбур во сите испитувани виногорја во Македонија, каде никогаш до сега не беше потврдено присуството на оваа група на фитоплазми;

17. Фитоплазмите од подгрупата столбур стануваат сè поголем проблем во регионите каде се одгледува виновата лоза. Најзагрозена сорта е *шардоне*, каде беше утврдена појава на столбурот во сите испитувани региони;
18. Столбурот се пренесува преку инсекти-вектори (цикади). Најчеста и потврдена цикада е *Hyalestes obsoletus*, која е позната и веќе одамна е евидентирана во светот, но не и кај нас. Останува отворено прашањето за начинот на пренесување на фитоплазмата столбур во наши услови;
19. Имајќи ги предвид податоците за присуството на *Flavescence dorée* кај нашите соседи (Србија и Хрватска), а и потеклото на садниот материјал во нашите виногорја (најчесто Србија и Италија), треба континуирано да се продолжи со следење на симптомите и присуството на векторите (особено да се внимава на појавата на *Scaphoideus titanus*);
20. Не постојат директни мерки за сузбивање на фитоплазмите. За спречување на проширување на болестите можат да се користат индиректни мерки, како: користење на здрав саден материјал, уништување на инсектите-вектори (цикади), механичко отстранување на заболените лози, уништување на плевелите во виноградарските региони кои се извор на зараза, уништување на останатата околна вегетација, каде одделни родови или видови можат да претставуваат можни домаќини на фитоплазмите (пр. дивата лоза).

8. ЛИТЕРАТУРА

1. **Avramov Z., Gillet J., Laginova M., (2008):** First detection of stolbur phytoplasma in Grapevines (*Vitis vinifera* cv. Merlot) Affected with grapevine Yellows in Bulgaria. *J. Phytopathology* 156, 112-114
2. **Avramov L., Nakalamić A., Žunić D., (1999):** Vinogradarstvo, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Zemun - Beograd
3. **Agrios G.N., (1997):** Plant pathology. Academic press. USA
4. **Angelini E., Clair D., Borgo M., Bertaccini A., Boudon-Padieu E. (2001):** Flavescence dorée in France and Italy - Occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to Palatinate grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma. *Vitis*, 40: 79-86
5. **Angelini E., Squizzato F., Lucchetta G., Borgo M., (2003):** Identification of a grapevine Flavescence doree-C phytoplasma and two deletion mutants in clematis. Extended abstracts of 14th meeting of ICVG, Locorotondo (Bari), Italy 60-61
6. **Avramov Z., Gillet J., Laginova M., (2008):** First detection of Stolbur Phytoplasma in Grapevines (*Vitis vinifera* cv. Merlot) Affected with Grapevine Yellows in Bulgaria. *J. Phytopathology* 156, 112-114
7. **Barbara D. J., Davies D. L., Clark M. F. (1998):** Cloning and sequencing of a major membrane protein from chlorate (*aster yellows*) phytoplasma. U: Proceedings of the 12th International Meeting of the International Organization for Mycoplasmaology. Abstract 4: 183
8. **Battle A., Martinez M.A., Lavina A. (2000):** Occurrence, distribution and epidemiology of Grapevine Yellows in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 106, 811-816
9. **Beanland L., Hoy C.W., Miller S.A., Nault L.R. (2000):** Influence of aster yellows phytoplasma on the fitness of the aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 93: 271-276
10. **Berg M., Seemüller E., (1998):** Chromosomal organization and nucleotide sequence of the genes coding for the elongation factors G and Tu of the apple proliferation phytoplasma. *Gene* 226: 103-109
11. **Bertaccini A., Vibio M., Stefani E. (1995):** Detection and molecular characterization of phytoplasmas infecting grapevine in Liguria (Italy). *Phytopatol. medit.*, 34, 137-141

12. **Bertaccini A., Vibio M., Schaff D.A., Murari E., Martini M., Danielli A. (1997):** Geographical distribution of elm yellows-related phytoplasmas in grapevine flavescence dorée outbreaks in Veneto (Italy). Extended abstracts of 12th ICVG Meeting, Lisbon, Portugal, 57-58
13. **Bertaccini A., (2007):** Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology, *Frontiers in Bioscience* 12, 673-689, January 1, 2007
14. **Borth W.B., Hamasaki R.T., Ogata D., Fukuda, S.K., Hu J.S. (2002):** First report of phytoplasmas infecting watercress in Hawaii. *Plant Disease* 86:331
15. **Botti A., Bertaccini A. (2003):** Molecular variability in Flavescence dorée phytoplasmas as marker for the disease outbreaks in vineyards, pp. 62-63. In Extended abstract of 14th Meeting of ICVG, Locorotondo, Italy. 12-17 September 2003. Department of Plant Protection and Applied Microbiology, University, Bary (Italy)
16. **Boudon-Padieu E., Daire X., Clair D., Lavina A., Batlle A., Reinert W., Maixner M., (1997):** Differentiation of grapevine phytoplasmas in the elm yellows and the stolbur group with the use of RFLP of non-ribosomal DNA, 55-56. Proc. 12th Meet. ICVG, Lisbon
17. **Boudon-Padieu E. (1999):** Grapevine phytoplasmas. First Internet conference on phytopathogeni mollicutes
<http://www.Uniud.it/phytoplasma/pap/boud8290.html>
18. **Boudon-Padieu E., (2000):** Recent advances on grapevine yellows detection, etiology, epidemiology and control strategies. Extended abstracts of 13th meeting of ICVG, Adelaide, Australia, 87-88
19. **Boudon-Padieu E., (2003):** The situation of grapevine yellows and current research directions: distribution, diversity, vectors, diffusion and control, pp. 47-53. In Extended abstract of 14th Meeting of ICVG, Locorotondo, Italy. 12-17 September 2003. Department of Plant Protection and Applied Microbiology, University, Bary (Italy)
20. **Bovey, R., Martelli, G.P. (1992):** Directory of major virus and virus-like diseases of grapevine. Description, historical review and bibliography. MFCIC/ICVG, Tunis, pp 111
21. **Caudwell A., (1957):** Deux années d'études sur la *Flavescence dorée*, nouvelle maladie grave de la vigne. *Annales de l'Amélioration des plantes*, 4, 359-363.
22. **Chen K.H., Guo J.R., Wu X.Z., Loi N., Carraro L., Guo Y.H., Chen Y.H., Osler R., Pearson R., Chen T.A., (1993):** Comparison of Monoclonal Antibodies, DNA probes, and PCR for Detection of the Grapevine yellows Disease Agent. *Phytopathology* 83: 915-922
23. **Cravedi P., Aldini R.N. (2000):** Occurrence of the flavescence dorée vector "*Scaphoideus titanus*" in Oltepo pavese, Italy, vineyards. *Plant Pathology* 27: 56-60

24. **Crocker, J., Wright, P., Deverell, P., Waite, H. (2003):** Australian advances in hot water treatment research, p. 71-72. In Extended abstract of 14th Meeting of ICVG, Locorotondo, Italy. 12-17 September 2003. Department of Plant Protection and Applied Microbiology, University, Bary (Italy)
25. **Daire, X., Clair, D., Larrue, J., Boudon-Padieu, E., Caudwell, A. (1993):** Diversity among mycoplasma-like organisms inducing grapevine yellows in France. *Vitis*, 32, 159-163
26. **Daire, X., Clair D., Reinert W., Boudon-Padieu E (1997)** Detection and differentiation of grapevine yellows phytoplasmas belonging to the elm yellows group and to the stolbur subgroup by PCR amplification of non-ribosomal DNA. *Eur J Plant Pathol* 103: 507-514
27. **Davis R.E., Sinclair W.A. (1998):** Phytoplasma identity and disease etiology. *Phytopathology* 88: 1372-1376
28. **Davis R.E., Dally E.L. (2001):** Revised subgroup classification of group 16SrV phytoplasmas and placement of flavescence dorée-associated phytoplasmas in two distinct subgroup. *Plant Disease* 85, 790-797
29. **Deng S., Hiruki C. (1991):** Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. *J. Microbial. Meth.* 14:53-61
30. **Doi Y., Teranaka M., Yora K., Asuyama H., (1967):** Mycoplasma or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches'-broom, aster yellows or paulownia witches'-broom. *Ann Phytopathol Soc Jap* 33: 259-266
31. **Државен завод за статистика (2007):** Попис на земјоделството, 2007, Книга II, 1-129
32. **Duduk B., Botti S., Ivanović M., Krstić B., Dukić N., Bertaccini A. (2004):** Identification of Phytoplasmas Associated with Grapevine Yellows in Serbia. *J. Phytopathology* 152, 575–579
33. **EPPO Reporting Service, 2006**
34. **Fox R.T.V. (1993):** Principles of diagnostic techniques in Plant pathology. University press, Cambridge, UK
35. **Gajardo A., Botti S., Montealegre J., Fiore N., Bertaccini A. (2003):** Survey on phytoplasmas identified in Chilean grapevines, p.85-86. In Extended abstract of 14th Meeting of ICVG, Locorotondo, Italy. 12-17 September 2003. Department of Plant Protection and Applied Microbiology, University, Bary (Italy)
36. **Gibb K.S., Constable F.E., Moran J.R., Padovan A.C. (1999):** Phytoplasmas in Australian grapevines – detection, differentiation and associated diseases. *Vitis*, 38, 107-114

37. **Girolami, V., Duso, C., Refatti, E., Osler, R. (1989):** Lotta integrata in viticoltura. IRIPA – COLDIRETTI. pp 1-100
38. **Goodwin P.H., Xue B.G., Kuske C.R., Sears M.K. (1994):** Amplification of plasmid DNA to detect plant pathogenic mycoplasma-like organism. *Ann Appl Biol* 124: 27-36
39. **Griffiths A., Wessler S., Lewontin R., Gelbart W., Suzuki D. (2005):** Introduction to genetic analysis. Eighth edition. Freeman and Company, New York
40. **Gundersen D.E., Lee I-M., Rehner S.A., Davis R.E., Kingsbury D.T. (1994):** Phylogeny of mycoplasma like organisms (phytoplasmas): a basis for their classification. *J. Bacteriol.* 176, 5244-5254
41. **Gundersen DE, Lee I-M, Schaff DA, Harrison NA, Chang CJ (1996):** Genomic diversity and differentiation among phytoplasma strains in 16S rRNA group I (aster yellows and related phytoplasmas) and III (X-disease and related phytoplasmas). *Int J Syst Bacteriol* 46: 64-75
42. **Harrison N.A., Tsai J.H., Bourne C.M., Richardson P.A. (1991):** Molecular cloning and detection of chromosomal and extrachromosomal DNA of mycoplasma like organism associated with witches' broom disease of pigeon pea in Florida. *Mol Plant-Microbe Interact* 4: 300-307
43. **Jarausch W., Saillard C., Dosba F., Bové, J.M. (1994):** Differentiation of mycoplasma-like organisms (MLOs) in European fruit trees by PCR using specific primers derived from the sequence of a chromosomal fragment of the apple proliferation MLO. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2916–2923
44. **Jones P. (2002):** Phytoplasma plant pathogens. *Plant Pathologist's Pocketbook* 3th edition. Waler J.M., Lenne J.M., Waller S.J. CABI Publishing UK
45. **Kirkpatrick B.C. (1992):** Mycoplasma-like organisms: plant and invertebrate pathogens. In the prokaryotes, 2nd edition, pp 4050-4067. Edited by Balows A., Truper H.G., Dworkin M., Harder W. and Sshleifer K.H., New York: Springer-Verlag
46. **Krake L.R., Scott N.S., Rezaian M.A., Taylor R.H. (1999):** Graft-transmitted disease of grapevines. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia
47. **Kuske C.R., Kirkpatrick B.C. (1990):** Identification and characterization of plasmids of the western aster yellows mycoplasma-like organisms. *J Bacteriol* 172: 1628- 1633
48. **Kuzmanović S., Martini M., Ivanovic Z., Josic D., Zivkovic S., Starovic M., (2007):** Detection and incidence of FD and BN phytoplasmas in vineyards of different grapevine cultivars in Serbia. *Bulletin of Insectology* 60, 371-372
49. **Langer M., Maixner M. (2004):** Molecular characterisation of grapevine yellows associated phytoplasmas of the stolbur-group based on RELP-analysis of non- ribosomal DNA. *Vitis* 43: 191-199

50. **Lee I.M., Davis R.E. (1992):** Mycoplasmas which infect plants and insects. *U:* Maniloff J, McElhansey RN, Finch LR, Baseman JB (eds) Mycoplasmas: Molecular biology and pathogenesis. Washington, DC, Am Soc Microbiol, 379-390
51. **Lee I.M., Gundersen-Rindal D.E., Hammond R.W., Davis R.E. (1994):** Use of micoplasmalike organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant. *Phytopathology* 84: 559-566
52. **Lee I.M., Gundersen-Rindal D.E., Bertaccini A., (1998):** Phytoplasma: ecology and genomic diversity. *Phytopathology* 88: 1359-1366
53. **Lee I.M., Davis R.E., Gundersen-Rindal D.E. (2000):** Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes. *Annual Review of Microbiology*, 54:221-255
54. **Maixner M. (1994):** Transmission of German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) by the plant-hopper *Hyalestes obsoletus* (Auchenorrhyncha: Cixiidae). *Vitis* 33, 103-104
55. **Maixner M. (2006):** Grapevine Yellows – Current developments and unsolved questions. Extended Abstract 15th Meeting of the International Council for the study of Virus-like diseases of the Grapevine, Stellenbosch, South Africa, 86-88
56. **Maixner M., Ahrens U., Seemüller E. (1995):** Detection of the German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by a specific PCR procedure. *Europ. J. Plant Pathology*, 101, 241-250
57. **Maixner M., Darimont H. (2000):** Transmission of grapevine yellows by *Oncopsis alni* (Schrank) (Auchenorrhyncha: Macropsinae). *Vitis* 39: 83-84
58. **Marcone C., Neimark A., Ragozzino A., Lauer U., Seemüller E., (1999):** Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology* 89: 805-810
59. **Marcone C., Lee I.M., Davis R.E., Ragozzino A., Seemüller E., (2000):** Classification of aster yellows group phytoplasmas based on combined analyses of rRNA and tuf gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 50, 1703-1713
60. **Martelli, G.P., Boudon-Padieu, E. (2006):** Directory of Infectious Diseases of Grapevines and Viroses and Virus-like Diseases of the Grapevine: Bibliographic Report 1998-2004. *Options Méditerranéennes, Série B: N.55*, pp 297
61. **Martini M., Murari E., Mori N., Bertaccini A. (1999):** Identification and Epidemic Distribution of Two *Flavescence Dorée* – Related Phytoplasmas in Veneto (Italy). *Plant Disease*, 83, 925-930

62. **Martini, M., Botti, S., Marcone, C., Marzachi, C., Casati, P., Bianco, P.A., Benedetti, R., Bertaccini, A. (2002):** Genetic variability among Flavescence dorée phytoplasmas from different origins in Italy and France. *Molecular and Cellular Probes* 16:197-208
63. **Martelli, G.P., Caudwell, A. (1993):** Grapevine yellows. In: Martelli G.P. (Ed.), *Graft-transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis*. FAO, Publication Division, Rome. 103-105
64. **Martelli, G.P. (2003):** Grapevine virology highlights 2000-2003. Extended abstracts of 14th meeting of ICVG, Locorotondo (Bari), Italy, September 12-17, 2003, 3-10
65. **Martelli G.P., Boudon-Padieu E., (2006):** Directory of Infectious Diseases of Grapevines and Viroses and Virus-like Diseases of the Grapevine: Bibliographic Report 1998-2004. *Options Méditerranéennes, Série B: N.55*, pp 297
66. **Marwitz R., (1990):** Diversity of yellows disease agents in plant infections. *Zentralblatt für bakteriologie, Suppl* 20, 431-434
67. **Milosavljević M., (1998):** Biotehnika vinove loze, Institut za istraživanja u poljoprivredi, Srbija, Beograd, 1-555
68. **Mitrović T., (1997):** Restrikciono mapiranje. Iz: Stevanović M. *Osnovi genetičkog inženjerstva: izolovanje, obrada i elektroforetska analiza DNA*. Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo
69. **Митрев С., Пејчиновски Ф., Козина Б., Мојсовски Т. (2001):** Појава на некои нови патогени промени кај виновата лоза во регионот, Годишен зборник 2001, Институт за јужни земјоделски култури, Струмица, 107-120
70. **Montano HG, Davis RE, Dally EL, Hogenhout S, Pimentel JP, Brioso PST (2001):** "Candidatus Phytoplasma brasiliense", a new phytoplasma taxon associated with hibiscus witches' broom disease. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 1109-1118
71. **Moretti G., Anaclerio F. (2000):** Influenza del trattamento con acqua calda su talee di alcuni vitigni (*Vitis vinifera* L.). I. Indicazioni preliminari. *Vignevini* 27 (7/8), 88-94
72. **Murrall D.J., Nault L.R., Hoy C.W., Madden L.V., Miller S.A. (1996):** Effects of the temperature and vector age on transmission of two Ohio strains of aster yellows phytoplasma by the aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *J. Ecol. Entomol.* 89, 1223-32
73. **Musetti, R., Sanità di Toppi, L., Marabottini, R., Borselli, S., Martini, M., Badiani, M., Osler, R. (2006):** The recovery of grapevine from phytoplasmas: Variation of antioxidant status in leaf tissues. Extended Abstracts of 15th Meeting of ICVG, 3-7, April 2006, Stellenbosch, South Africa, pp. 100-102
74. **Nakashima K., Hayashi T. (1997):** Sequence analysis of extracheomosomal DNA of sugarcane white leaf phytoplasma. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 63: 21-25

75. **Neimark H.C. (1986):** Origins and evolution of wall-less prokaryotes. U : S. Madoff (ed). The bacterial L-forms. Marcel Dekker Inc., New York, 21-42
76. **Newton C.R., Graham A. (1994):** PCR BIOS Scientific Publishers
77. **Nguyen T.L., Kube M., Schneider B., Reinhardt R., Gibb K., (2007):** An overview of the genome sequence of "*Candidatus* Phytoplasma australiense" - Australian strain, Bulletin of Insectology 60(2): 111-112
78. **Niemarck H., Kirkpatrick B.C., (1993):** Isolation and characterization of full-length chromosomes from non-culturable plant pathogenic mycoplasma-like organisms. Mol Microbiol 7: 21-28
79. **Osler, R., Carraro, L., Loi, N., Refatti, E. (1993):** Symptomexpression and disease occurrence of a yellows disease of grapevine in northeastern Italy. Plant Disease 77: 496-498
80. **Osler R., Carraro L., Loi N., Gregoris A., Pavan F., Firrao G., Musetti R., Ermacora P., Loschi A., Pertot I., Rafatti e., (1996):** Le piu importanti malattie da fitoplasmi nel Friuli-venezia Giulia. ERSA, Italia
81. **Osler, R., Carraro, L., Ermacora, P., Ferrini, F., Loi, N., Loschi, A., Martini, M., Mutton, P.B., Refatti, E. (2003):** Roguing: a controversial practice to eradicate grape yellows caused by phytoplasmas, p. 68. In Extended abstract of 14th Meeting of ICVG, Locorotondo, Italy. 12-17 September 2003. Department of Plant Protection and Applied Microbiology, University, Bary (Italy)
82. **Padovan A.C., Firrao G., Schneider B., Gibb K.S. (2000)** Chromosome mapping of the sweet potato leaf phytoplasma reveals genome heterogeneity within the phytoplasmas. Microbiology 146: 893-902
83. **Paltrinieri A.C., Gibb K.S., Bertaccini A., Vibio M., Bonfiglioli R.E., Fideghelli C., (2000):** Phytoplasma infection in peach and cherry in Italy. Proceedings of the 18th international symposium on virus & virus-like diseases of temperate fruit crops. Canterbury, UK, 9-15 July 2000, 365-369
84. **Pearson, R.C., Goheen, A.C. (1988):** Compendium of Grape Diseases. APS Press. USA
85. **Petrovič N., Jerej N., Ravnika M. (2000):** The Use of Tissue Culture for Improved Detection of Phytoplasma in grapevines. Extended abstracts of 13th Meeting ICVG, Adelaide, Australia, 119-120
86. **Posenato G., Mori N., Bressan A., Girolami V., Sancassani G.P. (2001):** *Scaphoideus titanus*, vettore della flavescenza dorata: conoscerlo per combatterlo L'informatore Agrario 15, 91-94
87. **Quacquarelli, A., Barba, M. (1992):** Flavescence dorée and other yellows of grapevine in EEC Countries. In: Martelli, G.P. (Editor), Grapevine Viruses and Certification in EEC Countries, State of the Art. Quaderno N° 3, Istituto Agronomico Mediterraneo, Bari, Italy. 41-47

88. **Razin S., Yogev D., Naot Y., (1998):** Molecular biology and pathology of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 1094-1096
89. **Rekab D., Carraro L., Schneider B., Seemüller E., Chen J., Chang C.J., Locci R., Firrao G. (1999):** Geminivirus-related extrachromosomal DNAs of the X-clade phytoplasmas share high sequence similarity. *Microbiology* 145: 1453-1459
90. **Romac S., Vukosavić S., Stojković O., Čuljković B., (1999):** PCR u kliničkoj dijagnostici. Biološki fakultet u Beogradu
91. **Saglio, P.H.M. and Whitcomb, R.F. (1979):** Diversity of wall-less prokaryotes in plant vascular tissue, fungi and invertebrate animals. In Witcomb, R.F. and Tully, J.G. *The mycoplasmas*. Academic Press, USA
92. **Schneider B., Seemüller E., Smart C.D. and Kirkpatrick B.C. (1995):** Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*. Vol. 2 pp 369-380. Edited by S. Razin and J.G. Tully, Academic Press, New York
93. **Schneider B., Gibb K.S., Seemüller E., (1997):** Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology* 143: 3381-3389
94. **Seemüller, E., Marcone, C., Lauer, U., Ragozzino, A, Göschl, M. (1998):** Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *Journal of Plant Pathology*, 80: 3-26
95. **Sinha, R.C. and Benhamou, N., (1983):** Detection of Mycoplasma like Organisms antigens from Aster Yellow-Diseases Plants by Two Serological procedures. *Phytopathology* 73: 1199-1202
96. **Smart C.D, Schneider B., Blomquist C.L., Guerra L.J., Harrison N.A., Ahrens U., Lorenz K-H., Seemüller E., Kirkpatrick B.C. (1996):** Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of 16S-23S rRNA spacer region. *Appl Environ Microbiol* 62: 2988-2993
97. **Smith I.M., McNamara D.G., Scott P.R., Holgrness M. (1997):** Quarantine pests for europe. 2nd ed. CAB INTERNATIONAL. University Press, UK
98. **Stevanović M., Arsić T., (1997):** Reakcija lančanog umnozavanja DNA-PCR (Polymerase chain reaction). Stevanovic M. Osnovi genetičkog inženjerstva: Izolovanje, obrada i elektroforetska analiza DNA. Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

99. **Šeruga M., Ćurković Perica M., Škorić D., Kozina B., Mirošević N., Šarić A., Bertaccini A., Krajačić M. (2000):** Geographic distribution of Bois Noir phytoplasmas infecting grapevines in Croatia. *J Phytopathol* 148: 239-242
100. **Šeruga M., Škorić D., Kozina B., Mitrev S., Krajačić M., Ćurković Perica M (2003):** Molecular identification of a phytoplasma infecting grapevine in the Republic of Macedonia. *Vitis* 42: 181-184
101. **Škorić D., Šarić A., Vibio M., Murari E., Krajačić M., Bertaccini A. (1998):** Molecular identification and seasonal monitoring of phytoplasmas infecting Croatian grapevines. *Vitis* 37: 171-175
102. **Tassart-Subirats, V., Clair, D., Grenan, S., Boudon-Padieu, E., Larrue, J. (2003):** Hot water treatment curing efficiency for phytoplasma infection and effects on plant multiplication material, p. 69-70. In Extended abstract of 14th Meeting of ICVG, Locorotondo, Italy. 12-17 September 2003. Department of Plant Protection and Applied Microbiology, University, Bary (Italy)
103. **Varga, K., Kölber, M., Martini, M., Pondrelli, M., Ember, I., Tökés, G., Lázár, J., Mikulás, J., Papp, E., Szendrey, G., Schweigert, A. and Bertaccini, A., (2000):** Phytoplasma identification in Hungarian grapevines by two nested-PCR systems. Extended abstracts of 13th meeting of ICVG, Adelaide, Australia, 113-115
104. **Vibio M., Bertaccini A., lee I.M., Davis R.E. Clark M.F., (1996):** Differentiation and classification of aster yellows and related European phytoplasmas. *Phytopathol. Mediterr.* 35, 33-42
105. **Weintraub P.G., Beanland L. (2006):** Insect Vectors of Phytoplasmas. *Annu. Rev. Entomol.*, 51: 91-111.
106. **Woese C.R. (1987):** Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51: 221-271

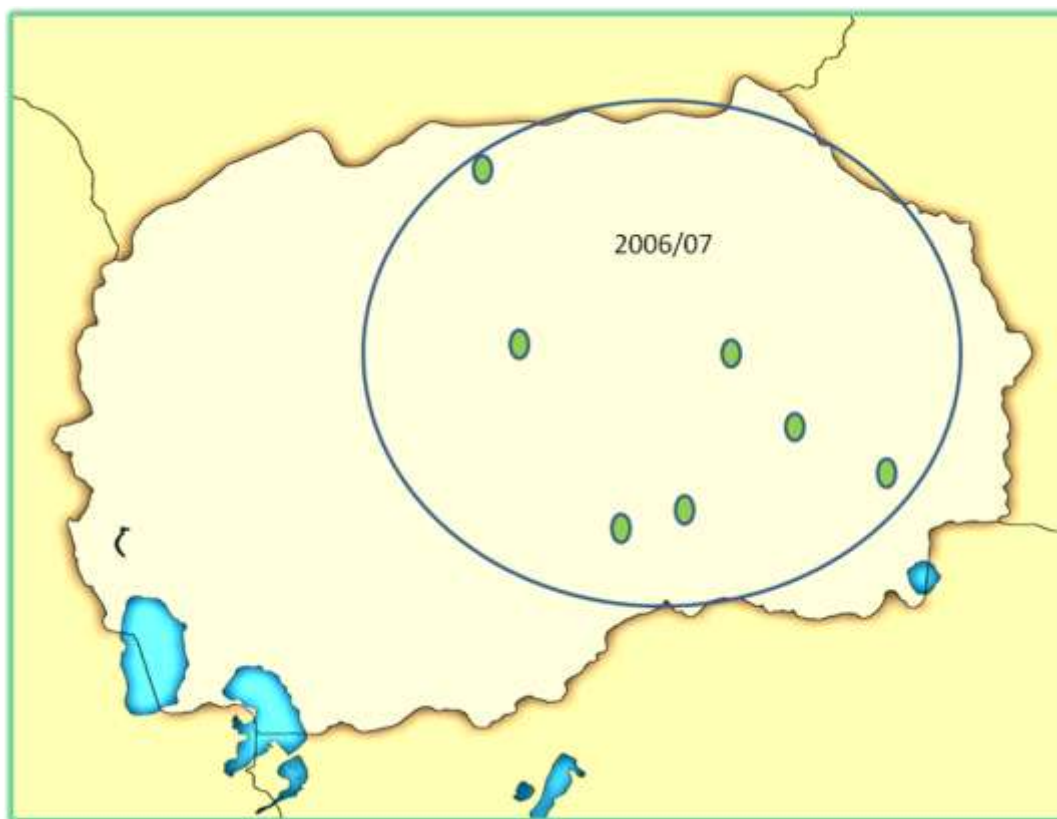
http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Flavescence_doree/PHYP64_ds.pdf

<http://www.mbio.ncsu.edu/MB451/lecture/firmicutes/lecture.html>)

<http://papilio.ab.a.u-tokyo.ac.jp/planpath/phyto-genome/index.html>)

<http://www.apsnet.org/Education/feature/poinsettia/images/figure8.htm>

9. ПРИЛОГ



Слика 29. Испитувани површини под винова лоза во сезоната 2006/07



Слика 30. Алармантна ситуација кај сортата *шардоне*, во лозовиот регион, Ило Виларов, Неготино



Слика 31. Симптоми кај соратата *смедеревка* (материјал колекциониран од лозовиот регион Три Чешми, Штипско)



Слика 32. Симптоми кај сортата *белан*, инфекција на целата лоза, керамидесто поставени листови



Слика 33. Незадрвенување, еластичност и лесна кршливост на ластарите, присуство на лисните дршки како резултат на опаѓање на симптоматичните листови



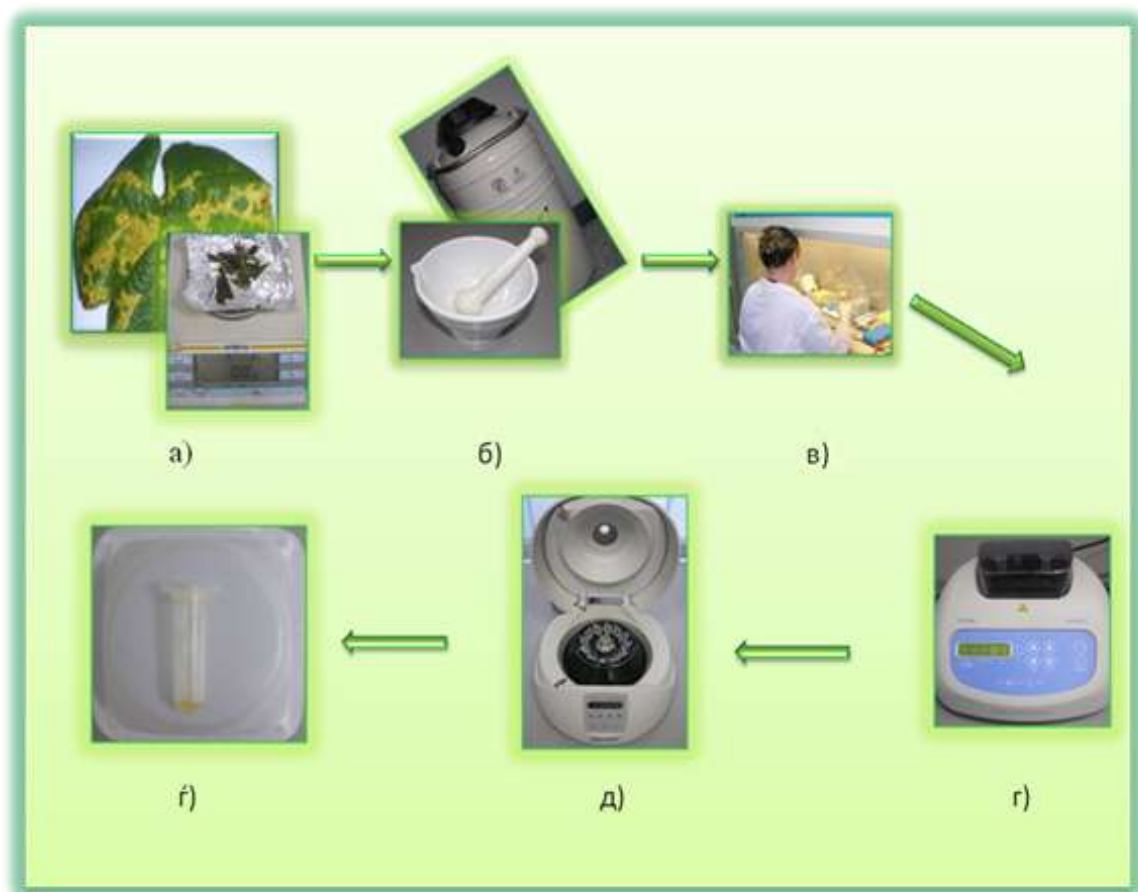
Слика 34. Симптоми кај сортата *вранец*, системично поцрвенување на листовите, незадрвенување на ластарот



Слика 35. Сушење на гроздовите кај сортите *вранец* и *шардоне*



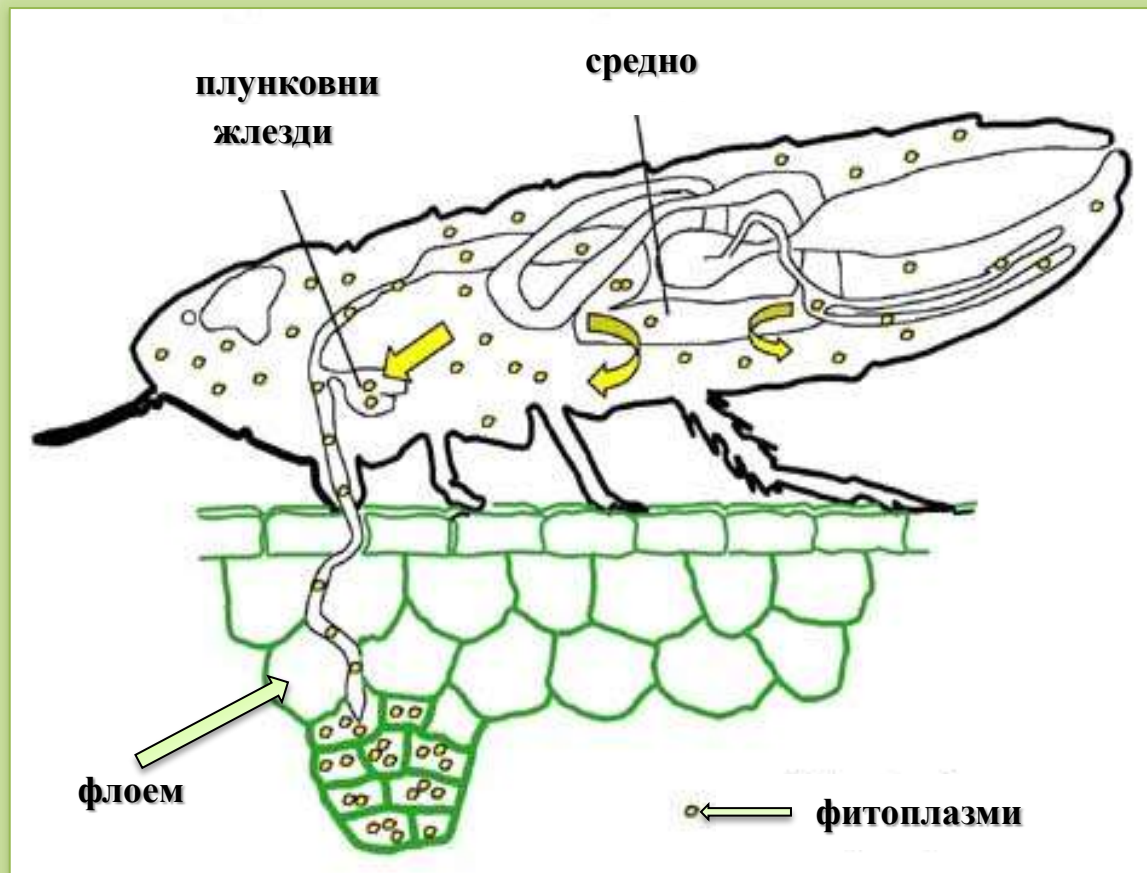
Слика 33. Колекционирање на симптоматичен материјал - листови од сортата *вранец* од лозовиот регион Добридол, Радовиш



Слика 34. Протокол за екстракција на ДНК од растителен материјал:

- а)** подготввување на растителниот материјал -1gr лисна нерватура;
- б)** хомогенирање во течен азот; **в)** ставање на 3% СТАВ+2-merkaptoetanol
- г)** инкубирање во водена бања на 65°C, 20 минути; **д)** центрифугирање со хлороформ, 10 мин., со изопропанол 15 мин. и со етанол 5 мин.;
- ф)** добиениот талог е екстрахираната ДНК, која се раствота во ТЕ пуфер и се чува на -20°C.

Начин на пренесување на фитоплазмите со инсекти-вектори (цикади)



Слика 35. Шематски приказ на пренесување на фитоплазмите со инсекти-вектори (цикади)



Ларва од *Scaphoideus titanus*



Imago - *Scaphoideus titanus*

Слика 36. *Scaphoideus titanus* - инсект-вектор на фитоплазмата *Flavescence dorée*



Hyalestes

Слика 37. *Hyalestes obsoletus* - инсект-вектор на фитоплазмата *Bois noir* (столбур)



Stictocephala bisonia

Слика 38. *Stictocephala bisonia* -предизвикувач на симптоми карактеристични за фитоплазмозите

Магистерски труд

**ФИТОПЛАЗМИТЕ КАКО ПРИЧИНИТЕЛИ НА ЖОЛТИЛО
КАЈ ВИНОВАТА ЛОЗА (*VITIS VINIFERA* L.) ВО РЕПУБЛИКА
МАКЕДОНИЈА**

Дипл. проф. биол. Емилија Накова

**Лектор: Даница Гавриловска-Атанасовска
Универзитет „Гоце Делчев“ Штип**

